

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor : Professor Dr. med. Hans Herken

Pharmakologische Beeinflußung
der hyaloplasmatischen Leber- und
mitochondrialen Gehirn-Aspartat-
Transcarbamylase

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Ingo Sarkander
Wien

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Pharmakologische Beeinflussung der hyaloplasmatischen Leber- und mitochondrialen Gehirn-Aspartat- Transcarbamylase

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Ingo Sarkander
Wien

Referent : Professor Dr. H e r k e n

Korreferent : Professor Dr. R i s s e



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 2.5.1973

A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Methoden</u>	6
I. Substanzen	6
II. Tiermaterial und Vorbereitung der Tiere	6
III. Aufarbeitung der Organe und Zellfraktionierung	7
a) Homogenat	7
b) Hyaloplasma	7
c) Mitochondrien	8
IV. Bestimmung der Aspartat-Transcarbamylase-Aktivität im Hyaloplasma und in den Mitochondrien	10
V. Messung der Radioaktivität	11
VI. DNA-Extraktion und DNA-Bestimmung	11
VII. Proteinbestimmung im Hyaloplasma	12
C. <u>Ergebnisse und Diskussion</u>	
I. Pharmakologische Beeinflussung der hyaloplasmatischen Leber-Aspartat-Transcarbamylase-Aktivität	
1. Einfluß von α -Hexachlorcyclohexan auf die hyalo- plasmatische Leber-Aspartat-Transcarbamylase	13
2. Wirkung unterschiedlicher Dosen Actinomycin D auf die α -Hexachlorcyclohexan induzierte Aktivitäts- steigerung der Aspartat-Transcarbamylase	17
a) nach einmaliger simultaner Gabe von α -Hexachlor- cyclohexan und Actinomycin D	19
b) nach 3- und 5-stündiger Vorbehandlung mit Actinomycin D	21
c) nach 3- und 5-stündiger Nachbehandlung mit Actinomycin D	21
3. Aktivität der Aspartat-Transcarbamylase nach Applikation von:	
a) Folsäure	22
b) 6-Aminonicotinsäureamid	26
c) Folsäure und 6-Aminonicotinsäureamid	27
d) Folsäure und Actinomycin D	30
e) 6-Aminonicotinsäureamid und Actinomycin D	32

II. Pharmakologische Beeinflussung der mitochondrialen

Gehirn-Aspartat-Transcarbamylase-Aktivität

1. Biochemischer Nachweis der Gehirn-Aspartat-Transcarbamylase in den Mitochondrien 33
2. Einfluß von α -Hexachlorcyclohexan auf die mitochondriale Gehirn-Aspartat-Transcarbamylase-Aktivität 39
3. Aktivität der Aspartat-Transcarbamylase nach simultaner Applikation von α -Hexachlorcyclohexan und 6-Aminonicotinsäureamid 44
4. Aktivität der mitochondrialen Gehirn-Aspartat-Transcarbamylase nach Gabe von Folsäure 46

- D. Zusammenfassung 47
- E. Literaturverzeichnis 50
- F. Danksagung 56
- G. Lebenslauf 57

Folgende Abkürzungen werden in dieser Arbeit benutzt:

ATCase	Aspartat-Transcarbamylase, Carbamylphosphat:L-Aspartat- Carbamyltransferase(E.C.2.1.3.2)
α -HCH	α -Hexachlorcyclohexan
6-AN	6-Aminonicotinsäureamid
AMD	Actinomycin D
DNA	Desoxyribonucleinsäure
RNA	Ribonucleinsäure
ATP	Adenosintriphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
M, m M	bezeichnen Konzentrationen
dpm	Zerfälle pro Minute
rpm	Umdrehungen pro Minute
hrs	Stunden
Ci, μ Ci	Curie, Mikrocurie
Tdr-Kinase	Thymidin-Kinase, ATP: Thymidin 5 ⁸ -Phosphotransferase (E.C.2.7.1.21)
N A D(P)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid- (-phosphat)
6-A N A D P	6-Aminonicotinsäureamid-adenin- dinucleotid-phosphat
ZNS	Zentralnervensystem
HWZ	Halbwertszeit

A. EINLEITUNG

Die Aspartat-Transcarbamylase (ATCase) katalysiert den ersten Schritt der Pyrimidinbiosynthese, die Transcarbamylation von l-Asparaginsäure und Carbamylphosphat zu Carbamylaspartat. Wegen des hohen Gruppenübertragungspotentials des Carbamylphosphats verläuft die Reaktion bevorzugt in Richtung des Carbamylaspartats.

In Bakterien hat die ATCase eine zentrale Position bei der Regulation des Durchflusses durch die Pyrimidinbiosynthesekette, denn das Enzym unterliegt sowohl einer negativen "feed-back-inhibition" durch eines der Endprodukte der Pyrimidinsynthese, dem Cytidintriphosphat (CTP), als auch einer Aktivierung durch Adenosintriphosphat (ATP), (YATES und PARDEE, 1956). Das native Enzym ist ein Hexamer, das sowohl aktive, substratbindende, als auch allosterische Zentren auf räumlich und physikalisch trennbaren Monomeren besitzt, (WEBER, 1968; GERHART, 1970; ROSENBUSCH und WEBER, 1971). Die Allosterie der ATCase, also die Möglichkeit der sterischen Konfigurationsänderung nach Reaktion des Enzyms mit Substrat, Inhibitor oder Aktivator wurde von GERHART und PARDEE, (1964) und MARKUS et al., (1971) nachgewiesen. Der allosterische Inhibitor, das CTP, wird reversibel an das allosterische Zentrum des Enzymproteins gebunden. Daraus resultiert eine verstärkte Bindung zwischen den Monomeren mit erschwertem Bindungsvermögen für das Substrat. CTP und ATP hemmen sich kompetitiv am allosterischen Zentrum der ATCase, (GERHART und PARDEE, 1962, 1964).

Weniger gut untersucht ist die Warmblüter-ATCase. Eine End-

produkt-Hemmung der ATCase durch CTP konnte in-vitro nicht nachgewiesen werden. Eine Hemmung des Enzyms durch andere Pyrimidin-derivate tritt nur bei unphysiologisch hohen Konzentrationen bei gleichzeitig erhöhter Substratkonzentration auf (DONACHIE, 1964; BRESNICK, 1963; BRESNICK und MOSSE, 1966; CYGAN und ZAK, 1967). Auch durch in-vivo Veränderung der intrazellulären Pyrimidinkonzentration nach Verfütterung einer 1% Orotsäure enthaltenden Diät an Ratten, konnte die ATCase nicht gehemmt werden (BRESNICK, 1968).

ZAK, 1969, konnte auf Grund von Untersuchungen an verschiedenen Rattenorganen zeigen, daß eine Beziehung zwischen ATCase-Aktivität der verschiedenen Organe und der Intensität ihrer Nucleinsäuresynthese besteht.

Nach Teilhepatektomie, ebenso in der nach vorangehender Schädigung regenerierenden Leber, wurde eine sofort einsetzende ATCase-Aktivitäts-Steigerung mit Maximum nach 48 hrs und einer Dauer bis zur vollständigen Wiedererlangung der ursprünglichen Organgröße beobachtet (CALVA, 1959). Dies läßt einen Zusammenhang zwischen ATCase-Aktivität und Organwachstum vermuten und kann möglicherweise zur Klärung des spezifischen Effektes des α -Hexachlorcyclohexans (α -HCH), der Lebervergrößerung beitragen.

Unter der Einwirkung von α -HCH kommt es anfänglich zur hyperplastischen Lebervergrößerung mit simultaner Vermehrung der Leber-DNA (SCHLICHT et al., 1968; OBERDISSE, 1969). Unerläßliche Voraussetzung für diese Vorgänge ist die vermehrte Bereitstellung von in der DNA vorkommenden Nucleotiden. Dies kann sowohl durch

eine gesteigerte enzymatische de-novo-Nucleotidsynthese als auch durch eine Erhöhung der Konzentration von präformierten Metaboliten des Nucleinsäurestoffwechsels und deren Reutilisation verwirklicht werden. Diese Überlegung führte zur Untersuchung der zeitlichen Synchronisation der durch α -HCH bewirkten Vorgänge mit den Aktivitäten der diese Vorgänge ermöglichenden Enzyme. Dabei wurde in dieser Arbeit als Indikatorenzym die ATCase gewählt wegen der bestehenden Beziehung zwischen ATCase-Aktivität und der Intensität der Nucleinsäuresynthese.

Das Kriterium für die Entscheidung, ob es sich bei einer α -HCH bewirkten Enzymaktivitäts-Steigerung um eine Induktion im Sinne der JACOB- und MONOD-Hypothese handelt, ist die Actinomycin D Sensitivität dieser Reaktion. Ist die Reaktion refraktär gegenüber dem Actinomycin D (AMD), dann wurde geprüft, ob es gleichzeitig zu einer Aktivitätssteigerung anderer AMD-empfindlicher Enzyme der gleichen Biosynthesekette kommt, so daß möglicherweise eine α -HCH Aktivierung eines Cistrons angenommen werden kann.

Bei der simultanen Applikation von α -HCH und kleinen Dosen AMD ($25 \mu\text{g/kg}$), die das durch α -HCH ausgelöste Leberwachstum bzw. den DNA-Zuwachs nicht verhindern, interessierte es, ob die in dieser Arbeit gefundene enge zeitliche Korrelation zwischen ATCase-Aktivitätsverlauf und DNA-Zuwachs weiterbesteht, oder ob es zu einer Dissoziation beider Vorgänge kommt, wie es von anderen Enzymen des Pyrimidinstoffwechsels bekannt ist (OBERDISSE, 1969).

Weiterhin wird die Beeinflußbarkeit der durch α -HCH induzierten

Vorgänge durch δ -Aminonicotinsäureamid (δ -AN) untersucht, da δ -AN möglicherweise über eine verminderte Bereitstellung von Ribose limitierend auf die Intensität der Nucleinsäuresynthese Einfluß nehmen kann (HERKEN, 1970, 1971 : LANGE et al. 1970 : KOLBE et al. 1971).

Das Verhalten der ATCase-Reaktion gegenüber anderen induktiv wirkenden Pharmaka wurde nach Folsäureapplikation untersucht, diese Versuche dienten gleichzeitig der Klärung der Frage, ob es sich bei der Folsäure-Wirkung um einen organspezifischen Effekt mit alleiniger Manifestation an der Niere handelt oder ob auch andere Organsysteme beeinflußt werden.

HERKEN und Mitarbeiter (1950, 1951, 1952) haben bei eingehenden Untersuchungen über den Einfluß der Isomeren des Hexachlorcyclohexans auf das Zentralnervensystem des Warmblüters deren antikonvulsive Wirksamkeit zeigen können, d.h. die Fähigkeit eine lang anhaltende Resistenz gegen zahlreiche krampfinduzierende Pharmaka auszulösen. Der biochemische Mechanismus der antikonvulsiven Wirkung der Hexachlorcyclohexane ist bisher nicht geklärt, jedoch ergaben Versuche über die Wirkungsweise zentral erregender oder hemmender Pharmaka eine Beteiligung der freien Nucleotide des Gehirns an den biochemischen Reaktionen, die mit diesen Funktionsänderungen, der Krampfesistenz oder der Krampfauslösung, einhergehen (KANIG und KORANSKY, 1961: COPER et al., 1962: PICCOLI et al., 1968: BONAVIDA et al., 1970).

Diese Kenntnis veranlaßte die Untersuchung des Einflusses von α -HCH auf die Aktivität der Gehirnatcase, denn wegen der unter-

schiedlichen Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für verschiedene Pyrimidinpräkursoren ist eine gesteigerte ATCase-Aktivität Voraussetzung für eine erhöhte intracerebrale Pyrimidin-de-novo-Synthese, die möglicherweise zur Klärung der antikonvulsiven Wirksamkeit des α -HCH beitragen kann. Denn die Pyrimidine enthalten in ihrer chemischen Konstitution die gleiche Atomgruppierung wie sie in fast allen antiepileptisch wirksamen Pharmaka vorliegt.

B. METHODEN

I. Substanzen

α -Hexachlorcyclohexan (Fa. Fluka) wurde in Rapsöl gelöst (2 %ig) und den Ratten in einer Dosis von 200 mg/kg Körpergewicht mit der Schlundsonde appliziert.

Auf eine intraperitoneale Injektion wurde aus zwei Gründen verzichtet:

- 1) mögliche Interferenz nicht resorbierten aber an die Organoberfläche (Leber) adsorbierten Rapsöls mit der Zellfraktionierung und der anschließenden enzymatischen Reaktion.

2) Peritonitisgefahr

Folsäure (E. Merck, Darmstadt) wurde als einmalige Dosis von 500 mg/kg Körpergewicht in 0,3 M Na-Bicarbonatlösung langsam i.v. injiziert. Zur Vermeidung von Krampfanfällen wurde die Folsäureinjektion in leichter Äthernarkose durchgeführt.

Actinomycin D lag in einer 0,9%igen NaCl-Lösung vor und wurde intraperitoneal injiziert. Die Dosierungen sind aus den Abbildungen ersichtlich.

6-Aminonicotinsäureamid wurde in einer Konzentration von 8 - 100 mg/kg Körpergewicht in 0,9%iger NaCl-Lösung i.p. injiziert.

II. Tiermaterial

Die Versuche wurden an weiblichen Albino-Ratten (Sprague-Dowley

und Wistar) mit einem Körpergewicht von 80 - 100 g bzw. 110-140 g durchgeführt, die während der Versuchsperioden Altromin R Trockenfutter der Fa. Altrogge und Leitungswasser ad libitum erhielten.

Dem circadianen Rhythmus der Tiere Rechnung tragend, wurde nur zu konstanten Zeiten vorbehandelt (morgens zwischen 9 - 11 Uhr) und um ganztägige Zeitintervalle verschoben zur gleichen Zeit ohne große Irritationen decapitiert. Decapitation, Organentnahme und die sich anschließende Zellfraktionierung wurden im Kälte-
raum(+ 4° C) vorgenommen.

III. Aufarbeitung der Organe und Zellfraktionierung

A) Homogenat

Nach der Decapitation und Ausblutung der Tiere erfolgte schnell die Herauspräparation der aufzuarbeitenden Organe. In einem Homogenisator vom Potter-Elvehjem-Typ wurden die isolierten Organe zerkleinert, als Homogenisationsmedium diente Saccharoselösung (0,25 M oder 0,32 M Saccharoselösung und 0,5 mM EDTA und 0,02 M Tris-HCL, pH 7,5). In Abhängigkeit von den Enzymaktivitäten in den verschiedenen Organen wurden Homogenate unterschiedlicher Konzentration hergestellt. (Verhältnis der ATCase-Aktivität Leber : Gehirn = 3 : 1). Anschließend wurde das Homogenat der Zellfraktionierung unterworfen.

B) Hyaloplasma

Das Homogenat wurde 10 min bei 1200 rpm in der Phywe-Eispirouette zentrifugiert, anschließend erfolgte die einstündige Zentrifugation

des so gewonnenen Überstandes bei 4' 000 rpm in der Ultrazentrifuge (Beckman Spinco L 50 im 50 Ti Rotor). Nur das mittlere Drittel des Überstandes des Zentrifugenröhrchens fand als Enzymquelle Verwendung, oberes und unteres Drittel des Überstandes wurden wegen der Möglichkeit der Kontamination mit Ribosomen (Mikrosomen) bzw. mit der sich auf der Oberfläche des Überstandes bildenden Fettschicht verworfen.

C) Mitochondrien

Die Isolierung der Mitochondrienfraktionen erfolgte nach dem von BASS, 1967 angegebenen Verfahren. Dieses hat gegenüber den üblichen Methoden den Vorteil des größeren Reinheitsgrades der Mitochondrienfraktion. Dieses Verfahren, ursprünglich für die Leberzellfraktionierung inauguriert, wurde hier für die Isolierung von Gehirn-Mitochondrienfraktionen angewandt.

Die Verwertung der "rohen" Mitochondrienfraktion (das Homogenat wurde zunächst 10 min bei 1400 rpm in der MSE-Mistral Zentrifuge zentrifugiert, das erhaltene Sediment in Homogenisationsmedium resuspendiert und 3mal 10 min bei 12 000 rpm in der Phywe-Eispirouette zentrifugiert) für den enzymatischen Ansatz erwies sich als unvorteilhaft, weil das gewählte Bezugssystem dpm/ μ g DNA der Mitochondriensuspension wegen der DNA-haltigen Kontamination dieser Fraktion nicht anwendbar war bzw. nicht reproduzierbare Werte ergab.

Deshalb wurden "reine" Mitochondrienfraktionen, die mit Hilfe einer Zwei-Schichten-Gradienten-Zentrifugation oder durch

Flotation im diskontinuierlichen Gradienten isoliert werden, für die weiteren Versuche verwendet. Bei dem Flotationsverfahren im diskontinuierlichen Gradienten wurde die "rohe" Mitochondrienfraktion in hochmolekularer Saccharoselösung (2,4 M) aufgenommen (Endkonzentration 1,7 - 1,8 M) und in das Zentrifugenröhrchen unter den Gradienten (Saccharoselösungen unterschiedlicher Konzentrationen: je 5 ml 1,65 M, 1,5 M, 1,4 M, 1,3 M und 0,32 M Saccharoselösung) gegeben. Bei der sich anschließenden zweistündigen Zentrifugation im SW 25 Schwingrotor der Spinco-Ultrazentrifuge L flotieren die Mitochondrien bei 24 000 rpm in die ihrer Dichte entsprechenden Saccharose-Schicht, während Zellbruchstücke sedimentieren (BASS, 1967).

Die verschiedenen beim Flotationsverfahren im diskontinuierlichen Gradienten gewonnenen Mitochondrienfraktionen wurden elektronenmikroskopisch auf Reinheitsgrad und Struktur- bzw. Funktionszustand untersucht, * um für den enzymatischen Ansatz die optimale Fraktion verwenden zu können.

Die einzelnen Mitochondrienfraktionen wurden verschieden aufbereitet und Vergleiche in bezug auf die enzymatische Aktivität von mit Ultraturrax und Ultraschall behandelten Präparationen mit unbehandelten intakten Mitochondrien vorgenommen.

Zur Differential-Zentrifugation wurde stets eine 0,32 M Saccharoselösung mit Zusätzen von 2 mM Tris-HCl und 0,5 mM EDTA, die auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt war, benutzt.

* Für diese Untersuchung bin ich Herrn Prof.Dr. H.-J.Merker sehr zu Dank verpflichtet.(Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin)

IV. Bestimmung der Aspartat-Transcarbamylase-Aktivität im Hyalo- plasma und in Mitochondrien.

Die Aktivitätsbestimmung der Aspartat-Transcarbamylase erfolgte im wesentlichen nach den von BRESNICK (1967) gemachten Angaben. Die Versuchsansätze enthielten folgende Bestandteile in einem Endvolumen von 1,5 ml:

l-Asparaginsäure-4-C¹⁴ 1,3 mM (0,1 µCi) ; Dilithiumcarbamylphosphat 5,0 mM ; 0,2 M Tris-HCl, pH 9,2 ; 0,2 ml Leberhyaloplasma (20%iges Homogenat in 0,25 M Saccharoselösung), bzw. 0,2 ml Gehirnmitchondriensuspension (Homogenat in 0,32 M Saccharoselösung mit Zusätzen von 2 mM Tris-HCl und 0,5 mM EDTA, eingestellt auf einen pH-Wert von 7,4).

Zur Kontrolle wurden Ansätze, die entweder kein Carbamylphosphat oder kein Enzym enthielten, simultan zu den kompletten Versuchsansätzen mitbestimmt.

Nach 15-minütiger Inkubation der Ansätze bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,2 ml 4N HClO₄ gestoppt, das denaturierte Protein durch Zentrifugation entfernt, der Überstand mit 4N KOH neutralisiert. Als Indikator diente Phenolrot. Das entstandene KClO₄ wurde nach 5-minütigem Stehen bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand auf eine Ionenaustauschersäule Dowex 50 H⁺ X 8 200 - 400 mesh gegeben (0,6 x 5,0 cm) und mit Wasser nachgewaschen. Die ersten 10 ml Eluat und Waschflüssigkeit enthielten das gesamte C¹⁴ - Carbamylaspartat, während das nicht umgesetzte markierte Aspartat vollständig an den Ionenaustauscher gebunden wurde. Ein aliquoter Teil des Eluates (0,5 ml)

wurde zur Zählung der Radioaktivität im Liquid-Scintillations-Counter in 14 ml Scintillationslösung aufgenommen.

Die colorimetrische Bestimmung des Carbamylaspartats mit der von KORITZ und COHEN 1954 angegebenen Methode zum Nachweis von Carbamylaminosäuren wurde versucht, fand aber wegen der nicht genügenden Spezifität keine weitere Anwendung.

V. Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivität wurde im Packard Liquid Scintillations Counter Modell 3375 mit einem externen Standard gemessen. Als Scintillationsflüssigkeit diente ein Gemisch aus Scintillations-Toluol (8 g 2,5 - Diphenyloxazol und 100 mg 1,4- bis 2-(4- Methyl-5- Phenyl-oxazol)-Benzol auf 2l Toluol und Alkohol im Verhältnis 4 : 3 . Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde 0,5 ml der zu untersuchenden Probe in 14 ml Scintillationsgemisch aufgenommen. Die Zerfälle pro Minute (dpm) wurden nach Bestimmung der Zählausbeute (Eichkurve) errechnet.

VI. DNA - Extraktion und DNA - Bestimmung

Die DNA wurde nach einer modifizierten OGUR- ROSEN- Methode(1950) mit Perchlorsäure extrahiert. 2ml der Mitochondriensuspension wurden mit 5 ml kalter 0,2 N Perchlorsäure, die 60 mM Pyrophosphat enthielt, gefällt. Dreimaliges Aufnehmen und Waschen des Sedimentes mit Perchlorsäure bewirkte die Entfernung der Saccharoselösung der Mitochondriensuspension. Nach Beendigung des Waschvorganges wurde das Sediment in 1,0 N Perchlorsäure aufgenommen und dadurch die RNA in der Kälte extrahiert. Die RNA- Extraktion benötigte 18 Stunden. Das Sediment der dann stattfindenden Zentrifugation wurde

3mal mit einem Äther-Alkohol-Gemisch (1 : 3) in der Kälte gewaschen. Weitere Waschungen mit Benzol, Äther und Alkohol schlossen sich an. Danach erfolgte die 15 minütige Extraktion der DNA bei 75° C mit 2 ml 0,5 N Perchlorsäure. Der durch Zentrifugation erhaltene Überstand der 75°-Extraktion wurde zur Bestimmung der DNA verwandt.

Wegen des geringen DNA-Gehaltes der Mitochondrien (ungefähr 0,5 - 1,0 % der Gesamtzell-DNA) ist die BURTON-Methode wegen ihrer Interferenz mit anderen chromogenen Substanzen für die Bestimmung der mitochondrialen DNA weniger geeignet als das von NEUBERT et al. (1965) angegebene Verfahren. Es wird die Extinktion der Lösung nach Diphenylamin- und Acetaldehyd- Zusatz bei drei verschiedenen Wellenlängen ($\lambda = 565, 595 \text{ und } 625 \text{ nm}$) gemessen. Der DNA-Gehalt errechnet sich dann aus $2 \times E_{595} - (E_{565} + E_{625})$, wobei E die Extinktion bei der entsprechenden Wellenlänge darstellt.

VII. Proteinbestimmung im Hyaloplasma

Die Bestimmung des Proteingehaltes des Leberhyaloplasmas erfolgte nach der Biuret-Methode unter Zusatz von Dehydrocholat. Als Standard wurde Rinder-Serum- Albumin verwendet. Leerwerte für die Trübung (gemessen ohne CuSO_4 -Zusatz) wurden regelmäßig mitbestimmt.

Neben der Biuret-Methode fand auch die WEICHELBAUM-Methode (1946) zur Proteinbestimmung Anwendung.

C.I. 1. Einfluß von α -Hexachlorcyclohexan auf die hyaloplasmatische Leber-Aspartat-Transcarbamylase.

Es ist bekannt, daß das α - Isomere des Hexachlorcyclohexans (α -HCH) eine besonders ausgeprägte, weitgehend reversible Zunahme des relativen Lebergewichtes (= Lebergewicht bezogen auf das Körpergewicht) bewirkt, (FITZHUGH, NELSON, FRAWLEY, 1950). Parallel zu dieser Fremdstoff-induzierten Lebervergrößerung kommt es zu einer Vermehrung der mikrosomalen Leberenzyme (REMMER und MERKER, 1963). Das Ausmaß und der zeitliche Verlauf der Organvergrößerung ist sowohl vom Alter der Versuchstiere als auch der Häufigkeit und Konzentration der α -HCH Applikation abhängig und erreicht mit 40 % nach einmaliger bzw. mit über 100 % Gewichtszunahme nach mehrmaliger Gabe von α -HCH (200 mg/kg) nach 4 Tagen ein Maximum (SCHLICHT et al. 1968). Die Lebervergrößerung ist bedingt durch eine Zunahme der Leberbestandteile annähernd im physiologischen Verhältnis (SCHULTE-HERMANN, 1968); pathohistologische Veränderungen der Leberarchitektur wurden nicht beobachtet. Jedoch ist nicht geklärt, ob eine Zunahme des Ploidiegrades der Leberparenchymzellen als pathognostisches Indiz wertbar ist (ALTMANN et al., 1966).

Zeitlich korreliert mit dem Leberwachstum ist eine Vermehrung des DNA- Gehaltes der Leber. Eine Voraussetzung hierfür ist eine erhöhte Bereitstellung von den in der DNA zu erwartenden Pyrimidin- und Purin- Nucleotiden. Dieser erhöhte Bedarf kann durch eine gesteigerte de-novo- Synthese sowie der Utilisation von präformierten Präkursoren realisiert werden. Die Reutilisation von DNA-Bausteinen spielt wahrscheinlich wegen der metabolischen

Stabilität der DNA kaum eine Rolle.

In diesem Zusammenhang interessierte der zeitliche Verlauf des ersten Schrittes der Pyrimidinbiosynthese, der durch die ATCase katalysierten Transcarbamylation. Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der ATCase-Aktivität im Leberhyaloplasma nach einmaliger Applikation von 200 mg α -HCH/kg Körpergewicht zeigt, daß dieses Pharmakon eine Enzymaktivitätssteigerung bewirkt, deren Maximum nach 48 hrs erreicht wird und 100 - 150% der Kontrollaktivität beträgt. Nach weiteren 48 hrs sind die Ausgangswerte wieder erreicht (Abb. 1).

Ob es sich bei der durch α -HCH-Applikation bewirkten ATCase-Aktivitätssteigerung um eine Induktion handelt, wurde durch die kombinierte Gabe von α -HCH und Actinomycin D (AMD) zu klären versucht (siehe C.I.2).

Möglicherweise bedingt der nach 48 hrs einsetzende Abfall der Enzymaktivitäten, der spätestens zu diesem Zeitpunkt bei allen untersuchten Enzymen des Pyrimidinstoffwechsels nach α -HCH Gabe auftritt (OBERDISSE et al., 1970), die Diskontinuität in der Steilheit der Zunahme des relativen Lebergewichtes sowie des DNA-Gehaltes. SCHLICHT et al. (1968) konnten zeigen, daß nach einmaliger Gabe von α -HCH die Zunahme beider Parameter - relatives Lebergewicht und DNA-Gehalt - diskontinuierlich in zwei Stufen verläuft. Die Stufenbildung erfolgt nach 48 hrs.

Vergleicht man die DNA-Vermehrung mit der Lebergewichtszunahme, beide in Prozent der Kontrollwerte, so ist das Ausmaß der DNA-Vermehrung geringer als der Gewichtszuwachs. Nur während der

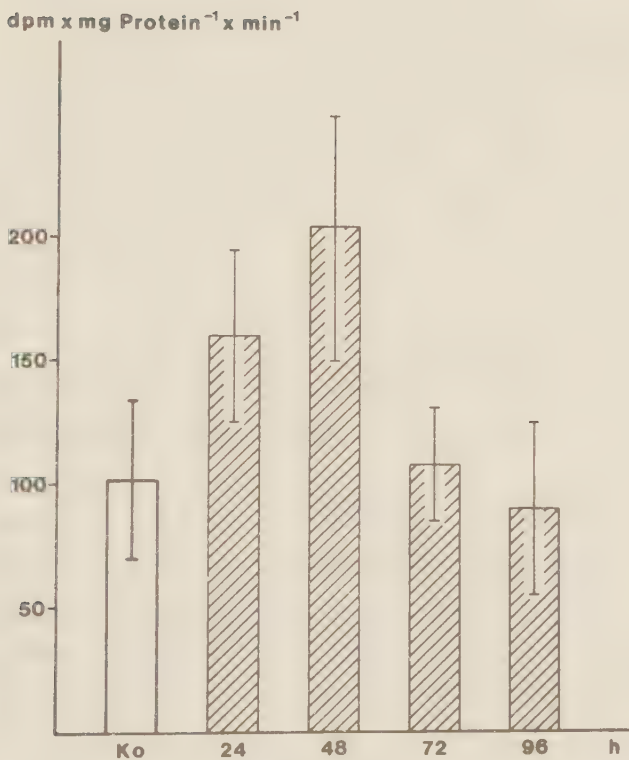


Abbildung 1

Zeitlicher Verlauf der Leber-Aspartat-Transcarbamylase-Aktivität nach einmaliger Gabe von α -Hexachlorcyclohexan.

Weibliche Sprague-Dowley-Ratten (120-150g). Nach einmaliger Applikation von 200 mg α -HCH/kg Körpergewicht wurde die ATCase-Aktivität zu verschiedenen Zeiten im Leberhyaloplasma bestimmt.

ersten 48 hrs liefern beide Vorgänge Werte annäherend gleicher Größenordnung. Innerhalb dieses Zeitintervalls kann daher das Leberwachstum durch reine Hyperplasie und Zunahme des Ploidiegrades der Parenchymzellen erklärt werden, später kommt zusätzlich eine Hypertrophie der Leberzellen hinzu.

C.I. 2. Wirkung unterschiedlicher Dosen Actinomycin D auf die
 α -Hexachlorcyclohexan-induzierte Aktivitätssteigerung der
Aspartat-Transcarbamylase.

Actinomycin D (AMD) ist ein Chromopeptid, das durch Komplexbildung mit der DNA zu einer Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase führt, da deren Aktivität vorwiegend an der durch AMD blockierten kleinen Furche der DNA-Doppel-Helix lokalisiert ist (KERSTEN et al., 1962; REICH et al., 1962; CAVALIERE et al., 1964; GOLDBERG und REICH, 1964).

Die Affinität zur AMD-DNA-Komplexbildung verschiedener DNA-Bezirke ist unterschiedlich, die Neigung nimmt mit dem Desoxy-guanosin-Gehalt der Matrizen-DNA zu. Über die Art dieses Komplexes gibt es zwei verschiedene Modellvorstellungen, das "outside-binding-Modell" von HAMILTON et al., 1963; REICH et al., 1963, 1964, wonach das AMD über Wasserstoffbrückenbindung an die Aminogruppe des Guanins in der kleinen Furche der DNA gebunden wird, sowie das "Intercalations-Modell" von MÜLLER und CROTHERS, 1968, das auch durch die Untersuchungen von WELLS und LARSON, 1970, bestätigt werden konnte.

Die Spezifität der AMD-Wirkung ist dosis-abhängig. Es werden neben der Hemmung der RNA-Synthese auch andere pharmakologische Effekte beobachtet, z.B. Beeinflussung der Purinribonucleotid-Synthese (WHEELER und BENETT, 1962), Blutdrucksenkende Wirkung bei Ratten (FREED und GEORGE, 1965), vermehrte Sekretion von NNR-Hormonen (SCHWARTZ et al., 1965), Störung der Proteinsynthese (RABINOVITZ, 1965) sowie eine akute Toxizität, die unabhängig von der Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase und deren sekundären Folgen ist.

Nach AMD-Applikation kommt es wegen der Beeinträchtigung der Transcriptions-Vorgänge zu einer Hemmung der RNA-Synthese mit konsekutiv verminderter Proteinsynthese. Diese wirkt sich zuerst und besonders ausgeprägt an den Enzym-Proteinen aus, die eine hohe Umsatzrate aufweisen und gleichzeitig eine kurze Halbwertszeit (HWZ) der zugehörigen sie codierenden m-RNA besitzen. Enzyme mit diesen Eigenschaften wären geeignet regulierend in Biosynthesen einzugreifen. Untersuchungen von OBERDISSE (1967, 1968, 1970) weisen darauf hin, daß die besonders AMD-empfindlichen RNA-Synthese-Reaktionen zur Bildung kurzlebiger m-RNA führen.

In diesem Zusammenhang interessierte der Einfluß unterschiedlicher Dosen AMD auf die α -HCH-induzierte Aktivitätssteigerung der hyaloplasmatischen Leber-ATCase.

Die kombinierte simultane Gabe von α -HCH (200 mg/kg) und AMD (25 μ g/kg) bewirkt keine Änderung im zeitlichen Verlauf der ATCase-Aktivität. Es kommt weder zu einer initialen Hemmung noch zu einer Phasenverschiebung des ATCase-Aktivitäts-Maximums.

Das Verhalten der ATCase-Aktivität stellt eine Ausnahme im Vergleich zu anderen untersuchten Enzymen der Pyrimidinsynthese dar (OBERDISSE, 1970), die sich selbst bei relativ kleinen Dosen als AMD-sensitiv erwiesen. Die Indifferenz der durch α -HCH gesteigerten ATCase-Aktivität gegenüber geringen Dosen AMD bei simultaner Applikation beider Pharmaka kann sowohl durch eine mangelnde Affinität des AMD zu dem die ATCase determinierenden DNA-Abschnittes der Matrize infolge eines nur geringen Gehaltes dieses Abschnittes an Desoxyguanosin bzw. dem Fehlen der sonstigen,

die Komplexierung fördernden Faktoren bedingt sein (WELLS und LARSON, 1970).

Die Bestimmung der HWZ der ATCase mit über 24 hrs in der nach partieller Hepatektomie regenerierenden Leber beweist die hohe Stabilität der die ATCase codierenden m-RNA (BRESNICK et al., 1967). Ob noch ein die m-RNA zusätzlich stabilisierender Effekt unter dem Einfluß von α -HCH auftritt, ist unbekannt.

Die AMD-Empfindlichkeit des die ATCase determinierenden DNA-Bezirks wurde durch unterschiedlich hohe Dosen AMD bei simultaner Applikation von α -HCH bzw. durch Vor- und Nachbehandlung mit AMD und alleiniger AMD-Gabe untersucht.

Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die ATCase-Aktivität beträgt 24 hrs nach einmaliger alleiniger Applikation von 1000 μ g AMD/kg Körpergewicht weniger als 50 % der Kontrollaktivität. Kein Tier überlebte 40 hrs nach Applikationsbeginn.
Die Gabe von 500 μ g/kg Körpergewicht bewirkt nach 24 hrs eine 20 %ige Hemmung der ATCase-Aktivität im Vergleich zu der Kontrollaktivität, die jedoch nach 48 hrs wieder erreicht wird. (Abb.2a)
2. Die simultane einmalige Applikation von α -HCH (200 mg/kg) und AMD (500 und 1000 μ g/kg) vermindert AMD-konzentrationsabhängig den alleinigen α -HCH-Effekt auf die ATCase-Aktivität. 24 hrs nach Applikation von :
 - a) 500 μ g AMD/kg kommt es zur 60 %igen Hemmung des α -HCH-Effektes.

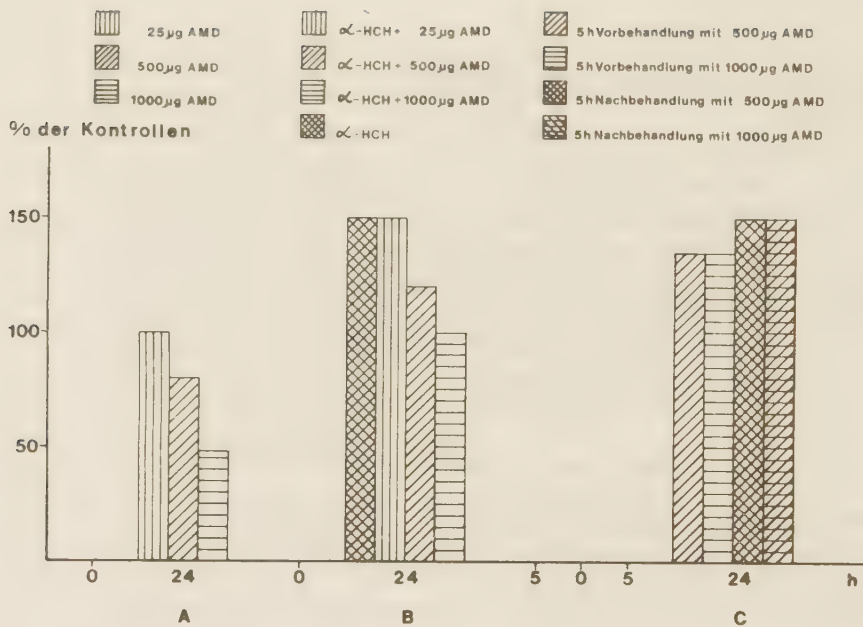


Abbildung 2

Weibliche Sprague-Dowley-Ratten (120-150g). Es wurde jeweils zur Zeit 0 appliziert und 24 Stunden (h) später die Aspartat-Transcarbamylase-Aktivität (ATCase) mit Ansatz IV. im Leberhyaloplasma bestimmt. Die Abb. 2 ergibt sich aus 4 unabhängig voneinander, unter gleichen methodischen Bedingungen, durchgeführten Versuchen.

100% Aktivität entsprechen $110 \text{ dpm} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

- A: Einfluß verschiedener Dosen Actinomycin D (AMD) in-vivo auf die hyaloplasmatische Leber-ATCase-Aktivität.
- B: Einfluß verschiedener Dosen Actinomycin D in-vivo auf die hyaloplasmatische Leber-ATCase-Aktivität nach simultaner Applikation von 200 mg α-Hexachlorcyclohexan (α-HCH) / kg Körpergewicht und AMD.
- C: Wirkung unterschiedlicher Dosen AMD in-vivo auf die α-HCH induzierte Aktivitätssteigerung der hyaloplasmatischen Leber-ATCase nach 5-stündiger Vor- bzw. Nachbehandlung mit AMD.

- b) 1000 μg AMD/kg kommt es zur vollständigen Aufhebung der α -HCH-induzierten ATCase-Aktivitätssteigerung. (Abb. 2b)
3. AMD-Vorbehandlung vermindert den α -HCH-Effekt auf die ATCase-Aktivität. Es wurden sowohl 5 als auch 3 hrs vor der α -HCH-Applikation jeweils 500 bzw. 1000 μg AMD/kg Körpergewicht verabreicht und 24 hrs später die ATCase-Aktivität bestimmt. Dabei ergab sich ein sowohl von der Vorbehandlungsdauer als auch von der gewählten AMD-Konzentration unabhängiger ATCase-Aktivitätsverlust von annähernd 30%. (Abb. 2c)
4. Werden in 3- bzw. 5-stündigem Abstand nach der α -HCH-Gabe jeweils 500 bzw. 1000 μg AMD/kg Körpergewicht gegeben, so kommt es im Vergleich zur alleinigen α -HCH-Applikation nicht zur Beeinträchtigung der ATCase-Aktivität. (Abb. 2c)
5. Eine inanitionsabhängige Veränderung der ATCase-Aktivität war während der Versuche nicht zu beobachten.

Eine Interferenz der Wirkung beider Pharmaka, die zu einer Verminderung der α -HCH-induzierten ATCase-Aktivitätssteigerung führt, scheint nur möglich zu sein, wenn eine zeitliche Beziehung bei der Applikation von α -HCH und AMD eingehalten wird. Ist dies nicht der Fall, so könnte die AMD-Unempfindlichkeit der Reaktion dadurch verursacht sein, daß die durch α -HCH bewirkten Induktionsvorgänge eine Autonomie erlangen und somit einer weiteren Beeinflussung durch AMD nicht mehr zugänglich sind.

C.I. 3a. Aktivität der Aspartat-Transcarbamylase nach Folsäure-
gabe.

Die akute Nephrotoxizität hoher Folsäuredosen (500 mg/kg) mit anschließender Regeneration der vorwiegend geschädigten proximalen Tubuluszellen ist durch die Arbeit von BRADE, (1969) bekannt. Das Ausmaß der nach Folsäureapplikation bedingten Schädigung konnte durch die Nierenfunktionsprüfung mittels der Inulin- und PAH- Clearance, der Bilanzierung des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes sowie zusätzlicher elektronenmikroskopischer Untersuchungen bestimmt werden. Während der Regenerationsphase kommt es zur Nierenvergrößerung mit deutlicher Zunahme des Trockengewichtes sowie des DNA-, RNA- und Proteingehaltes des Organs, (THIELFALL et al., 1966; BRADE et al., 1969). Diese durch die Folsäure verursachten Proliferationsvorgänge scheinen durch eine Stimulierung der Genaktivität bedingt zu sein, da sie durch Actinomycin vermindert bzw. aufgehoben werden können.

Eine Zunahme des DNA- und RNA- Gehaltes in der regenerierenden Niere hat eine vermehrte Bereitstellung von den in der DNA und RNA zu erwartenden Nucleotiden zur Voraussetzung. OBERDISSE (1971), konnte nach hohen Folsäuredosen (500mg/kg) eine Induktion der Enzyme der Pyrimidin-Biosynthese in der regenerierenden Niere nachweisen. Dabei zeigten die Aspartat-Transcarbamylase und die Tdr-Kinase, im Unterschied zu den anderen untersuchten Enzymen, bereits nach 24 hrs eine signifikante Aktivitätssteigerung. Dieser Befund spricht dafür, daß die Proliferationsphase der Folsäuregeschädigten Niere sowohl durch eine vermehrte de-novo-Pyrimidinsynthese als auch durch die Verwendung präformierter Pyrimidin-

Nucleotide eingeleitet wird.

Es interessierte nun, ob es sich bei den ausgeprägten Veränderungen an der Niere nach Folsäureapplikation um einen organspezifischen Effekt des Pteridinanteils der Folsäure handelt, oder ob auch andere Organe, wie z.B. die Leber beeinflusst werden. So könnten die Funktionsänderungen und die Proliferationserscheinungen in der Niere ihre Erklärung finden durch die extrem hohe Konzentrierung der Folsäure in den proximalen Tubuluszellen, in denen die Folsäure sogar kristallisiert nachweisbar ist, und folglich die an der Niere bekannten Erscheinungen auch an anderen Organen erwartet werden könnten, käme es zu ähnlichen Konzentrationsverhältnissen der Folsäure in ihnen wie in der Niere. Denn auch in der Niere ist das Ausmaß der Folsäure-bedingten Veränderungen konzentrationsabhängig, (THREFALL et al., 1966).

Diese Fragen veranlaßten die Untersuchung des Verhaltens der Leber-Aspartat-Transcarbamylase nach Folsäureapplikation.

Durch eine einmalige intravenöse Injektion einer hohen Dosis Folsäure (500 mg/kg Körpergewicht) wird die hyaloplasmatische Leber-Aspartat-Transcarbamylase in ihrer Aktivität gesteigert. Bereits 24 hrs nach der Folsäureapplikation ist eine signifikante Enzymaktivitätssteigerung nachweisbar, deren Maximum nach 48 hrs erreicht wird (60% der Kontrollaktivität) und nach 72 hrs wieder im Bereich der Kontrollwerte liegt. (Abb. 3)

Dieser Befund zeigt, daß der Folsäure-Effekt auf die Niere

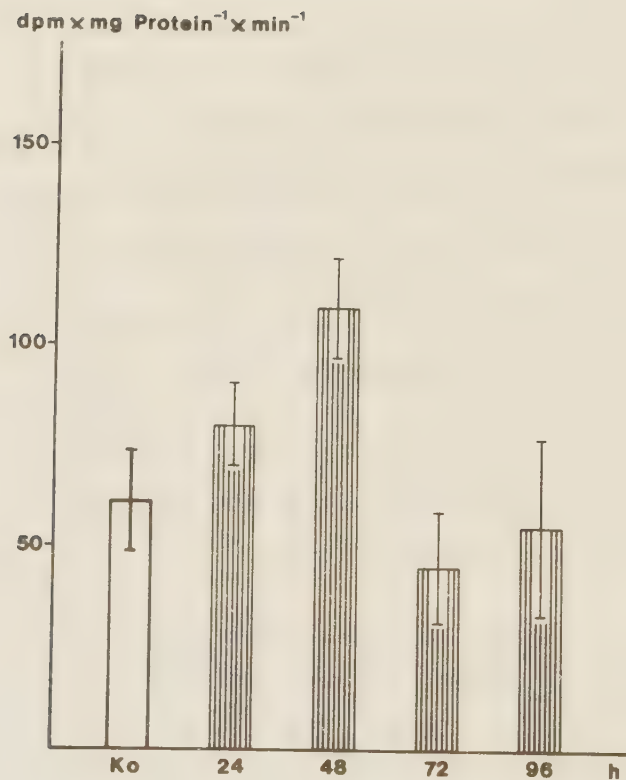


Abbildung 3

Zeitlicher Verlauf der Leber-Aspartat-Transcarbamylase-Aktivität nach einmaliger Gabe von Folsäure.

Weibliche Wistar-Ratten (120-150g). Die Aktivität der ATCase wurde nach einmaliger i.v.-Applikation von 500 mg Folsäure/kg Körpergewicht zu verschiedenen Zeiten im Leberhyaloplasma bestimmt.

nicht organspezifisch ist, sondern daß sich gleichartige Veränderungen, wie die an der Niere beobachteten, auch an anderen Organen nachweisen lassen.

Die Intensität der Veränderungen ist möglicherweise eine Funktion der Folsäurekonzentration im Organ, seiner Blastempotenz und Histoarchitektur.

C.I. 3b. Aktivität der hyalo-plasmatischen Leber-Aspartat-Trans-carbonylase nach einmaliger Applikation von 6-Aminonicotinsäureamid.

Untersucht man den zeitlichen Verlauf der ATCase-Aktivität im Leberhyalo-plasma nach einmaliger Applikation unterschiedlicher Dosen von 6-Aminonicotinsäureamid (6- AN) (8 und 16 mg 6- AN/kg), so zeigt sich eine konzentrationsabhängige Aktivitätssteigerung des Enzyms, deren Maximum bei 24 hrs bei Gabe von 16 mg 6- AN/kg liegt und 60-80% der Kontrollaktivität beträgt. Nach weiteren 24 hrs werden die Basiswerte wieder erreicht. Höhere Dosen 6- AN (50-100 mg/kg) bewirken keinen weiteren Anstieg der ATCase-Aktivität.

Erklärungsmöglichkeit:

1. Direkte Beeinflussung der ATCase durch 6- AN. 6- AN als Enzymaktivator.
2. Isolierter induktiver Effekt des 6- AN auf den die ATCase determinierenden Genabschnitt, (siehe C.I. 3e).
3. Stabilisierung des Messengers der ATCase.
4. Indirekte kompensatorische ATCase-Aktivitätssteigerung verursacht durch eine verminderte Konzentration von den die ATCase-Aktivität mitregulierenden Substraten infolge einer teilweise gehemmten Nucleotidsynthese nach 6- AN-Applikation.

Die aus einer ATCase-Aktivitäts-Steigerung resultierende kompensatorisch erhöhte Pyrimidinmetabolit-Konzentration wäre nur solange notwendig, bis über den nicht oxydativen Teil des Pentose-Phosphat-Cyclus ausreichend Ribulose-5-Phosphat und damit 5-Phospho-Ribosyl-Pyrophosphat zur Verfügung gestellt werden würde.

C.1. 3c. Zeitlicher Verlauf der Leber-Aspartat-Transcarbamylase-
Aktivität nach simultaner Applikation von Folsäure und
6- Aminonicotinsäureamid.

Nach einmaliger simultaner Applikation von 500 mg Folsäure/kg i.v. und 8 mg 6- AN/kg i.p. beträgt die Aktivitätssteigerung der Leber-ATCase nach 24 hrs annähernd dem additiven Effekt der Einzelwirkungen der beiden Pharmaka. Nach weiteren 24 hrs ist jedoch eine signifikante Verminderung des Folsäureeffektes durch 6- AN nachweisbar. Mit dem 72 hrs-Wert liegt die Enzymaktivität wieder im Bereich der Kontrollwerte.

Nach Applikation von 6- AN kommt es nach einer Latenzzeit, deren Dauer abhängig ist von der Dosis des verabreichten 6- AN, innerhalb der die Biosynthese des 6- ANADP aus NADP durch die im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte relativ unspezifische NAD(P)-Glykohydrolase erfolgt, zu einer Hemmung der NADP-abhängigen Enzyme des oxydativen Teils des Pentose-Phosphat-Weges. Aus der Hemmung der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase und im verstärkten Maße der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase kann über eine Verminderung der Ribosekonzentration eine Beeinträchtigung der RNA-Synthese resultieren, wie Versuche mit U-¹⁴C-D-Glukose gezeigt haben, (HERKEN et al., 1969, 1970). Somit scheint der Pentose-Phosphat-Weg über eine verringerte Ribosekonzentration regulierenden Einfluß auf die Intensität der Nucleinsäure-Synthese auszuüben.

Im Maximum der Folsäure-Wirkung auf die ATCase-Aktivität, also zum Zeitpunkt des höchsten Bedarfs an Ribose bzw. 5-Phosphoribosylpyrophosphat, kann es möglicherweise durch die gleichzeitige

Applikation von 6- AN und der dadurch bewirkten Hemmung des oxydativen Pentose-Phosphat-Weges bzw. anderer NADP-abhängiger Enzyme des Nucleinsäurestoffwechsels, wie z.B. der Ribonucleotid-Reductasen, zu einer herabgesetzten Nucleinsäuresynthese mit konsekutiver Verminderung des Durchflusses durch die Pyrimidinsynthesekette kommen. Die daraus resultierende Anhäufung von Carbamylaspartat könnte eine Produkthemmung der ATCase, also eine Verminderung des Folsäure-Effektes auf die ATCase-Aktivität durch 6-AN , bewirken.

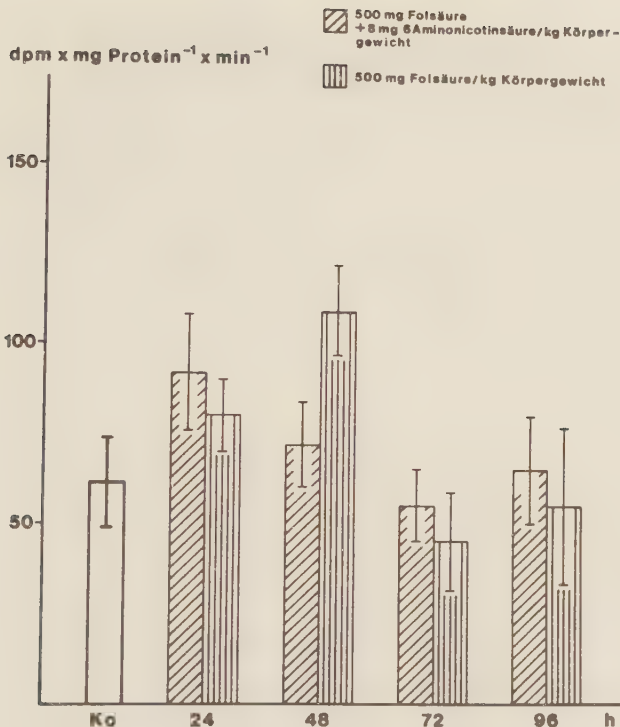


Abbildung 4

Zeitlicher Verlauf der Leber-Aspartat-Transcarbamylase-Aktivität nach einmaliger simultaner Gabe von Folsäure und 6-Aminonicotinsäureamid.

Weibliche Wistar-Ratten (120-150g). Verschiedene Zeiten nach einmaliger simultaner Applikation von 500 mg Folsäure/kg Körpergewicht und 8 mg 6-Aminonicotinsäureamid/kg Körpergewicht wurde die Aktivität der ATCase im Leberhyaloplasma bestimmt.

C.I. 3d. Einfluß von Actinomycin D auf die Folsäure-induzierte
Aktivitätssteigerung der hyaloplasmatischen Leber-Aspartat-
Transcarbamylase.

Untersucht man die ATCase-Aktivität 24 hrs nach simultaner Applikation von 500 mg Folsäure/kg Körpergewicht i.v. und 500 µg AMD/kg Körpergewicht i.p., so findet man eine vollständige Aufhebung des Folsäure-Effektes auf die ATCase-Aktivität, die durch die inhibitorische Wirksamkeit des AMD unter die Kontrollwerte gesenkt wird.

Die ausgeprägte Empfindlichkeit der Folsäure-induzierten ATCase-Aktivitätssteigerung gegenüber AMD spricht für eine durch die Folsäure bewirkte Stimulierung der Genaktivität des die ATCase determinierenden DNA-Matrizen-Abschnittes, also für eine Enzym-induktion der ATCase. Ob der Folsäure-Wirkungsmechanismus auf einer Struktur- und Funktionsänderung der Histone des Chromatins infolge von Acetylierungs- Methylierungs- und Phosphorylierungsreaktionen beruht, die zu einer Genderepression mit erhöhter RNA-Transkription an den Nucleohistonmatrizen führen könnte, ist Gegenstand von Untersuchungen.

STOCKEN, (1968) konnte an der nach partieller Hepatektomie regenerierenden Leber nachweisen, daß eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Phosphorylierung des Histons f_1 und dessen biologischer Aktivität für die RNA-Synthese besteht. POGO et al., (1968) und ALLFREY (1970) stellten ebenfalls an der regenerierenden Leber 2 hrs nach 2/3 Hepatektomie eine erhöhte Acetylierungsrate der argininreichen Histone f_{2a1} und f_3 fest.

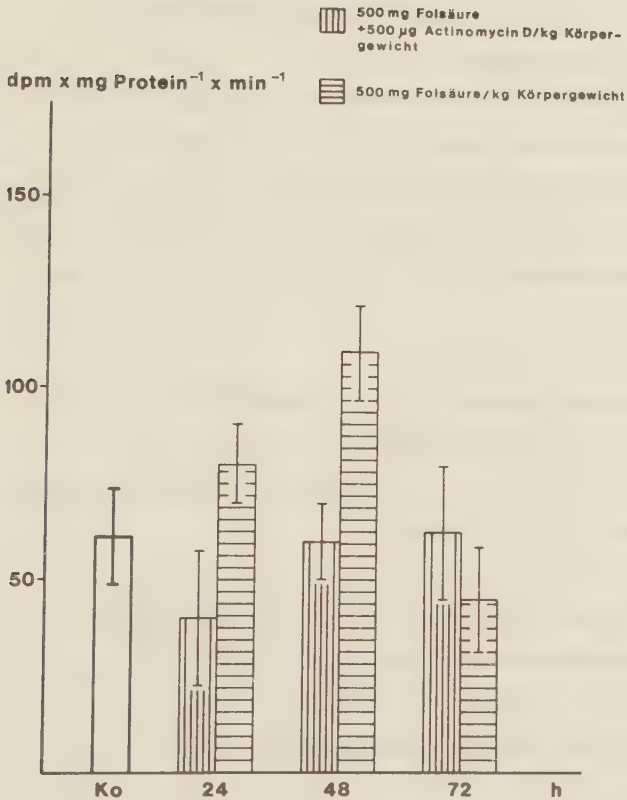


Abbildung 5

Einfluß von Actinomycin D auf die Folsäure-induzierte Aktivitätssteigerung der hyaloplasmatischen Leber-Aspartat-Transcarbamylase. Weibliche Wistar-Ratten (120-150g). Die Aktivität der Aspartat-Transcarbamylase wurde zu verschiedenen Zeiten nach simultaner Applikation von 500 mg Folsäure/kg Körpergewicht und 500 µg Actinomycin D/kg Körpergewicht im Leberhyaloplasma bestimmt.

C.1. 3e. Aktivität der hyaloplasmatischen Leber-Aspartat-Trans-carbamylase nach simultaner Applikation von 6- Aminonicotin-säureamid und Actinomycin D.

Die konzentrationsabhängige Stimulierung der Leber-ATCase-Aktivität durch 6- AN wird in ihrem zeitlichen Verlauf durch unterschiedliche Dosen AMD nicht beeinflusst. Es kommt weder zu einer initialen Hemmung noch zu einer Phasenverschiebung der durch 6- AN bewirkten ATCase-Aktivitätssteigerung.

Folgende Versuche wurden durchgeführt:

1. Simultane Applikation von 8 mg 6- AN/kg Körpergewicht und 25 µg bzw. 250 µg AMD/kg Körpergewicht.
2. Simultane Applikation von 16 mg 6- AN/kg Körpergewicht und 25 µg bzw. 250 µg AMD/kg Körpergewicht.

Die Unempfindlichkeit der 6- AN bewirkten ATCase-Aktivitätssteigerung gegenüber unterschiedlichen AMD-Dosen spricht gegen eine Enzyminduktion im Sinne der Jacob-Monod-Hypothese, da induktive Vorgänge gewöhnlich besonders AMD-sensitiv sind.

C.II. 1. Biochemischer Nachweis der Gehirn-Aspartat-Transcarbamylase in den Mitochondrien.

Durch die Arbeiten von BRESNIK (1966) und BOTTOMLEY (1967) war bekannt, daß die ATCase verschiedener Rattenorgane (Leber, Niere, Milz und Thymus) ein hyaloplasmatisches Enzym ist. Der Nachweis der Ratten-gehirn-ATCase in den Mitochondrien des Gehirns gelang SPORS (1970) durch Kombination einer histochemischen und elektronenmikroskopischen Methode. Zuvor hatten bereits LOWENSTEIN und COHEN (1956) und APPEL und PETTIS (1967) in Gehirnhomogenaten eine ATCase-Aktivität nachgewiesen.

Biochemische Untersuchungen über die Lokalisation und Beeinflußbarkeit der Gehirn-ATCase-Aktivität und damit der intracerebralen Pyrimidin-de-novo-Synthese standen jedoch aus.

Durch systematische Zellfraktionierung gelang der biochemische Beweis der Lokalisation des Enzyms in den Mitochondrien des Gehirns. Zur Bestimmung der intramitochondrialen Verteilung der ATCase-Aktivität wurden Mitochondrien-Fragmentierungen mittels Ultraschall und des Ultraturrax-Homogenisators durchgeführt. Nach der Zentrifugation der Membranfragmente wurde die ATCase-Aktivität vorwiegend im Sediment nachgewiesen, aber auch der Überstand (Mitochondrienmatrix) zeigte eine enzymatische Aktivität, die möglicherweise durch Ablösung des Enzymproteins von den Membranstrukturen während der Fragmentation bedingt war.

Zur Feststellung der optimalen Voraussetzungen für den enzymatischen Ansatz wurden die Mitochondrien-Präparationen nach verschiedenen Verfahren durchgeführt (BASS, 1967) und die gewonnenen

Mitochondrienfraktionen elektronenmikroskopisch auf Reinheitsgrad und Strukturzustand untersucht*(Abb.7A,7B). Folgende Verfahren zur Isolation und Präparation der Mitochondrienfraktionen wurden durchgeführt:

1. Differentialzentrifugation
2. Flotation im Zweistufen-Saccharose-Gradienten
3. Flotation im diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten

Weiterhin wurden für den enzymatischen Ansatz mit Ultraschall und Ultraturrax-Homogenisator behandelte Mitochondrienfraktionen benutzt, die wegen des erleichterten Zutritts von Substrat zum Enzym während der Inkubationszeit, also einer begünstigten Enzym-Substrat-Bindung, höhere ATCase-Aktivitätswerte ergaben.

Es ist bekannt, daß die mitochondriale DNA etwa 0,5% der Gesamtzell-DNA ausmacht. Bei einer HWZ der mitochondrialen DNA von 8 Tagen (NEUBERT et al.,1966; BASS und NEUBERT, 1966;NEUBERT et al.,1968) müßten innerhalb von 24 hrs etwa 8% durch neusynthetisierte DNA ersetzt werden. Innerhalb der gleichen Zeit würde in Abhängigkeit von der Generationszeit der Zellen der verschiedenen Organe ein bestimmter Anteil der Zellkern-DNA neugebildet werden. So würde z.B. bei einer Generationszeit der Leberzellen von annähernd 200 Tagen (MAC DONALD, 1961) 0,5% der Zellkern-DNA in 24 hrs neu gebildet werden. Hieraus ergibt sich für die Leber ein Verhältnis der DNA-Syntheseleistung von nuclearer DNA zu mitochondrialer DNA von 90 zu 10%. Dieses Verhältnis wird bei Organen mit längerer Generationszeit als die der Leber weiter zu Gunsten des prozentualen Anteils der mitochondrialen DNA-Synthese an der Gesamt-DNA-Synthese verändert, am extremsten bei aus irreversibel postmitotischen Zellen bestehenden Organen, d.h. Organen, die unter physiologischen Bedingungen ihre Teilungsfähigkeit wegen ihrer

*Für diese Untersuchung danke ich Herrn Prof.Dr.H.-J.Merker
(Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der F .U. Berlin)

1. Präparation

Schicht Nr.

1

2

3

4



2. Präparation

Schicht Nr.

1

2

3

4

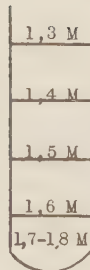


Abbildung 6

zeigt die 4 Mitochondrien-Schichten der beiden unabhängig voneinander hergestellten Präparationen, die sich durch Flotation im diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten nach 2-stündiger Zentrifugation in der Spinco Ultrazentrifuge (Rotor SW 25) im Zentrifugenröhrchen bildeten. Als optimal in bezug auf den Reinheitsgrad erwies sich bei beiden unabhängig voneinander hergestellten Präparationen die Schicht Nr. 2

Das mittlere Zentrifugenröhrchen gibt die den Schichten zuzuordnenden Saccharosekonzentrationen (in M) an.

Vereinigung der Mitochondrien-Präparation durch:

Art der Mitochondrien-Präparation	Mitochondrien	Mikrosomen	Myelin	Lysosomen microbodies	Sonstiges
1. Differentialzentrifugation (2x gewaschen)	+	++	++	++	+
2. Zweistufen-Saccharose-Gradient	+(+)	+	+	+	+
3. Flootation im diskontinuierlichen Gradienten					
I. Präparation					
Schicht	++	+	(+)	+	(+)
1					
2	+++(+)	(+)	-	(+)	-
3	(+)	+	+(+)	+(+)	+
4	+(+)	+	+(+)	+	+
II. Präparation					
Schicht	+(+)	+	(+)	+	+
1					
2	+++(+)	(+)	-	(+)	-

Tabelle Nr. 1:

Abhängigkeit des Reinheitsgrades bzw. der Vereinigung der Mitochondrienfraktionen von der Art der Mitochondrien-Präparation als Ergebnis der elektronenmikroskopischen Untersuchung. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung der durch Flootation im diskontinuierlichen Gradienten gewonnenen Mitochondrienfraktion wurden zwei unabhängig voneinander hergestellte Präparationen verwendet.

hohen zytoplasmatischen Differenzierung verloren haben. Allgemein wird dieses von vielen Zellen des ZNS erwachsener Individuen angenommen.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsache erscheint die Lokalisation der Gehirn-ATCase in den Mitochondrien zellökonomisch.

Der Einbau von ^3H -Thymin in die mitochondriale DNA verschiedener Rattenorgane ergab, daß die spezifische Aktivität der mitochondrialen DNA der untersuchten Organe, mit Ausnahme des Gehirns, Werte gleicher Größenordnung lieferte (NEUBERT et al., 1968). Dieser Befund kann möglicherweise durch die unterschiedliche Kompartimentierung der ATCase in den Zellen der Organe erklärt werden. Die geringere spezifische Aktivität der mitochondrialen DNA des Gehirns kann verursacht sein durch einen relativ höheren intramitochondrialen Thymin-Pool wegen der intramitochondrialen Lokalisation der ATCase im Vergleich zu den Organen, in denen die ATCase im Hyaloplasma gefunden wird. Denn bei diesen Organen ist die mitochondriale Pyrimidinkonzentration zusätzlich eine Funktion der Membranpermeabilität der Mitochondrien für die Pyrimidine. Allerdings ist der Thymin-Einbau in die DNA nicht nur eine Funktion des Thymin-Pools und dessen intrazellulärer Kompartimentierung, sondern kann durch weitere Faktoren z.B. der Aktivität der Thyminkinase und der Thymin abbauenden Enzyme beeinflusst werden. Weiterhin nicht geklärt ist, ob die unterschiedlichen Halbwertszeiten der mitochondrialen DNA der verschiedenen Organe der Realisation entsprechen oder durch Unterschiede in der Effizienz der Reutilisation der DNA-Präkursoren bedingt ist.

Die Kenntnis der unterschiedlichen Lokalisation der ATCase kann

die Lösung dieser Frage erleichtern.

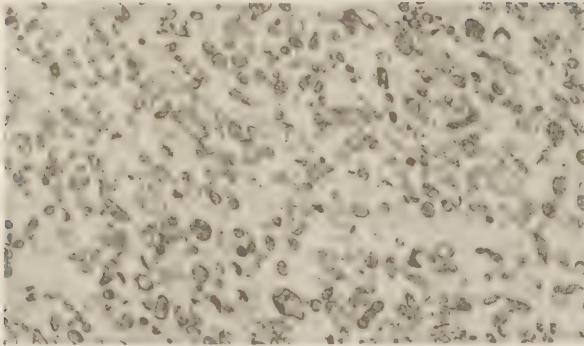


Abbildung 7 A: Schnitt durch die nach Flotation im diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten gewonnene Mitochondrienfraktion (Schicht Nr.2) *

Vergrößerung: 1 : 7 000

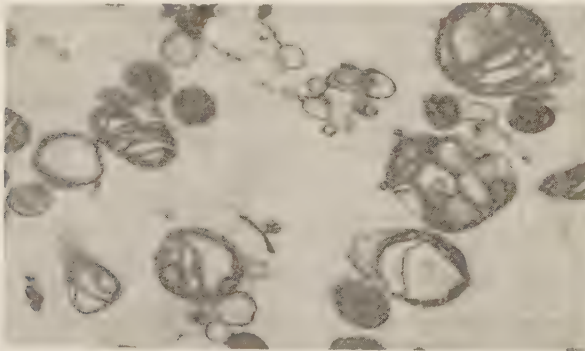


Abbildung 7 B: Gleiche Mitochondrienfraktion jedoch höhere Vergrößerung. *

Vergrößerung: 1 : 35 000

* Die Bilder wurden freundlicherweise hergestellt und überlassen von Herrn Prof.Dr.H.-J.Merker, Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin.

C.II. 2. Einfluß von α -Hexachlorcyclohexan auf die mitochondriale
Gehirn-Aspartat-Transcarbamylase.

Die Bedeutung der Pyrimidin-Nucleotide für das Gehirn ergibt sich unter anderem aus ihrer Funktion als Coenzyme des Lipidstoffwechsels und als Präkursoren bzw. Substrate der Nucleinsäure-, Polysaccharid- und Glykogensynthese (DAWSON, 1967 und 1968; WONG und SOURKES, 1968; APPEL und SILBERBERG, 1968; FLANGAS und BOWMAN, 1970). So konnten GEIGER und YAMASAKI, 1956; COOK et al., 1963; einen Zusammenhang zwischen funktionellen Gehirnleistungen und Pyrimidin-Nucleotiden nachweisen.

Die intracerebrale Pyrimidin-Metaboliten-Konzentration scheint wegen der unterschiedlichen Permeabilität - teilweise relativen Impermeabilität - der Blut-Hirn-Schranke für verschiedene Präkursoren des Pyrimidinstoffwechsels überwiegend eine Funktion der cerebralen "de-novo-Pyrimidinsynthese zu sein und im geringeren, jedoch wechselndem Ausmaß abhängig von präformierten Pyrimidin-Metaboliten, vorwiegend hepatischen Ursprungs ("salvage-Stoffwechsel"). Diese erreichen über die arterielle Circulation nach Permeation der Blut-Hirn-Schranke das Gehirn.

WELLS et al., 1963 und ADAMS, 1965, beobachteten bei der Nucleotid- und RNA-Synthese des Rattengehirns eine bevorzugte Utilisation von "de-novo"-synthetisierten Pyrimidinderivaten gegenüber präformierten Pyrimidinen. HELD und WELLS, 1969, konnten analoge Verhältnisse für den Purinstoffwechsel nachweisen. SEEGMILLER et al., 1967, zeigten jedoch die Wichtigkeit der Purin-"salvage"-Enzyme, so wurde bei der Choreoathetose und beim LASH-NYHAN-Syndrom ein Enzym-

defekt der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase nachgewiesen.

Notwendige Voraussetzung für die Beurteilung des Ausmaßes und der Relation des "de-novo" und "salvage"-Pyrimidinstoffwechsels ist die exakte Kenntnis von Größe und Umsatz des intracerebralen Pyrimidinpools.

In diesem Zusammenhang interessierte die Abhängigkeit des durch α -HCH bewirkten antikonvulsiven Effektes von der freien Nucleotid-Konzentration des Gehirns (HEJLEN, 1950, 1951), denn zentral erregende oder hemmende Pharmaka lassen eine Beteiligung der freien Nucleotide des Gehirns an biochemischen Reaktionen erkennen, die mit diesen Funktionsänderungen einhergehen (KANIG und KORANSKY, 1961, COPER et al., 1962, PICCOLI et al., 1968, BONAVITA et al., 1970). Untersuchungen über die Konzentration der freien Pyrimidin- und Purin-Nucleotide des Gehirns, bzw. deren Änderung nach und während durch Elektroschock ausgelösten Krämpfen ergaben eine deutliche Beziehung zwischen Krampffaktivität und Pyrimidin-Nucleotid-Konzentration. So stieg z.B. die UMP-Fraktion der Pyrimidine 10 sec. nach dem Elektroschock auf das achtfache der Kontrollwerte an (PICCOLI und CAMARDA, 1969).

Es sei jedoch auf den begrenzten Wert der durch elektrische Stimulierung induzierten Krämpfe bei diesen Untersuchungen hingewiesen, da es sich um einen unphysiologischen Reiz handelt, der nicht mit den patho-physiologischen und chemischen Veränderungen des Gehirns einhergeht, die selbst krampfauslösend wirken. Der Vorteil dieser Methode ist die Auslösung reproduzierbarer Krämpfe.

Nach einmaliger Applikation von 80 mg/kg α -HCH werden 70-80 % der

behandelten Ratten gegen eine mit Sicherheit krampferzeugende Dosis Pentetrazol unempfindlich (HERKEN, 1950). Diese Krampffresistenz hält ungefähr 10 Tage an (COPER, 1951). Der Wirkungsverlust des Pentetrazols nach α -HCH-Vorbehandlung beruht nicht auf der erhöhten Metabolisierung des Pharmakons infolge der durch α -HCH-induzierten mikrosomalen Leberenzyme, da die Krampffresistenz wesentlich früher auftritt als die durch α -HCH bewirkte Verminderung der Pentetrazol-Konzentration im Gehirn (VOHLAND und KORANSKY, 1972).

Es ist weiterhin bekannt, daß der antikonvulsive Effekt des α -HCH durch Gabe von Nicotinsäureamid reduzierbar bzw. aufhebbar ist. Nicotinsäureamid bewirkt einen Anstieg der NAD-Konzentration im Gehirn, vorwiegend bedingt durch Stimulierung der NAD-Synthese (KAPLAN, 1959, 1960). Die daraufhin vermutete Wechselwirkungsbeziehung zwischen HCH-Wirkungsmechanismus und Pyridinstoffwechsel konnte experimentell nicht bestätigt werden, denn eine Änderung der Pyridin-Nucleotid-Konzentration des Gehirns tritt weder im durch Pentetrazol erzeugten Krampf noch in der durch α -HCH bedingten Krampffresistenz auf (COPER, 1960). Folglich kann der HCH-Effekt nicht in einem dem Nicotinsäureamid-Effekt entgegengesetzten Verhalten seine Ursache haben.

Wegen der Korrelation zwischen mitochondrialer Gehirn-ATCase-Aktivität und der Intensität der cerebralen Pyrimidin-"de-novo"-Synthese sowie deren Bedeutung für das Gehirn wurde die Beeinflussbarkeit dieses Enzyms durch α -HCH untersucht.

In den Versuchen nach einmaliger Applikation von 200 mg/kg α -HCH konnte eine Aktivitätssteigerung der Gehirn-Aspartat-Transcarbamylase

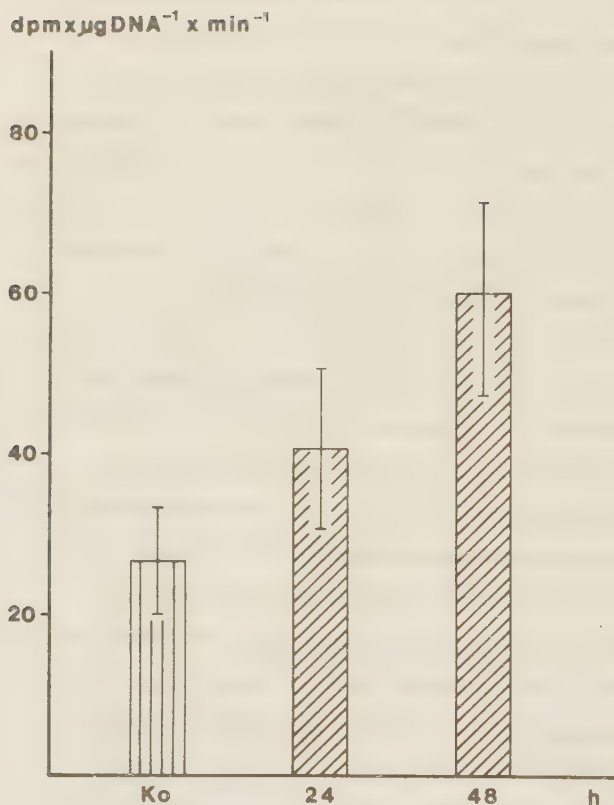


Abbildung 8

Aktivitätssteigerung der mitochondrialen Gehirn-Aspartat-Trans-carbamylase nach einmaliger Applikation von α -Hexachlorcyclohexan. Weibliche Wistar-Ratten (80-100g). Nach einmaliger Gabe von 200 mg α -HCH/kg Körpergewicht wurde die Aspartat-Transcarbamylase-Aktivität zu verschiedenen Zeiten in der Gehirn-Mitochondrien-Suspension bestimmt.

nachgewiesen werden, die die Voraussetzung für eine Erhöhung der Pyrimidin-Nucleotid-Konzentration gewährleistet. Die Aktivitätssteigerung des Enzyms betrug nach 48 hrs annähernd 100% der Kontrollaktivität.

Möglicherweise kann die erhöhte Pyrimidin-Nucleotid-Konzentration nach α -HCH Applikation den antikonvulsiven Effekt des α -HCH erklären, denn die Pyrimidine enthalten in ihrer chemischen Konstitution die gleiche Atomgruppierung wie die meisten antiepileptisch wirksamen Pharmaka.

Die Aufhebung der durch α -HCH bewirkten Krampfbesistenz nach Gabe von Nicotinsäureamid kann verursacht sein durch die Konkurrenz um das für die weitere Synthese, sowohl der Pyrimidinnucleotid- als auch der Pyrimidinnucleotidsynthese, gemeinsam benötigte 5-Phosphoribosylpyrophosphat bzw. dessen Vorstufen. Die nach Gabe von Nicotinsäureamid bevorzugt ablaufende Pyrimidinnucleotidsynthese und die daraus resultierende kompetitive Hemmung der Orotophosphoribosyltransferase mit Verminderung der Pyrimidinnucleotid-Konzentration läßt die zur Krampfbesistenz benötigten Pyrimidinnucleotide nicht in ausreichender Konzentration entstehen.

In diesem Zusammenhang sei als Analogon erwähnt, daß die antikonvulsive Wirkung der Barbiturate, die bekanntlich ebenfalls Pyrimidinderivate sind, auch konzentrationsabhängig ist, denn bei geringer Dosierung besitzen sie nur sedativ-hypnotische Wirkung. Auch bei diesen Pharmaka besteht eine Dosis- und Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen Barbituratkonzentration und neurophysiologischer Funktion im Sinne einer Erhöhung der Krampfschwelle.

C.II. 3. Aktivität der Aspartat-Transcarbamylase nach einmaliger simultaner Applikation von α -Hexachlorcyclohexan und 6-Aminonicotinsäureamid.

Es wäre interessant zu wissen, ob durch die Hemmung des oxydativen Teils des Pentose-Phosphat-Weges nach 6-AN Applikation die Pyrimidin-de-novo-Synthese, gemessen an der ATCase-Aktivität, beeinflusst und damit die Beziehung Pyrimidin-Nucleotid-Konzentration und antikonvulsiver Effekt im Sinne vermehrter oder verminderter Krampfesistenz verändert wird.

Nach einmaliger simultaner Applikation von 200 mg α -HCH/kg und 10 mg 6-AN/kg Körpergewicht ergab sich eine Aktivitätssteigerung der ATCase nach 48 hrs, die deutlich über dem Wert lag, der nach alleiniger Gabe von 200 mg α -HCH/kg erhalten wurde, jedoch geringer war als der Summation der Einzeleffekte entsprochen hätte. Als Möglichkeit der Erklärung des bei simultaner Applikation beider Pharmaka beobachteten Effektes wird auf die bereits in C.I.3b. angeführten Punkte verwiesen.

Ob die Verlängerung der Barbituratnarkose nach 6-AN-Gabe (COPER et al., 1968), die wie der Vergleich des zeitlichen Verlaufes der Barbituratkonzentration im Serum von behandelten und unbehandelten Tieren zeigte, nicht auf einem verzögerten Abbau von Barbiturat in der Leber beruht, durch die Interferenz von zugeführtem Barbiturat(170mg/kg) mit der gleichzeitig gesteigerten intrazellulären Pyrimidinsynthese oder durch die Nettoerhöhung beider Pyrimidinderivate erklärt werden kann, ist nicht entschieden.

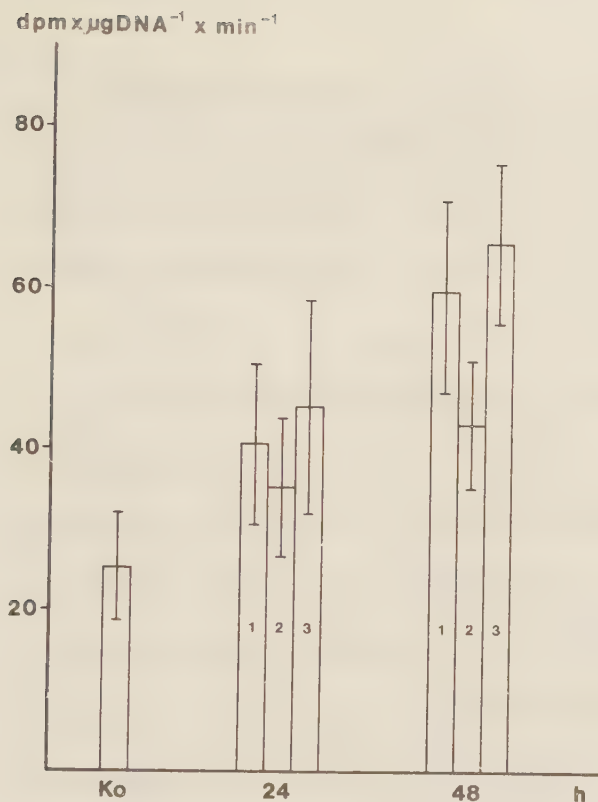


Abbildung 9

Verhalten der mitochondrialen Gehirn-Aspartat-Transcarbamylase nach simultaner Applikation von α -Hexachlorcyclohexan und 6-Aminonicotinsäureamid.

Weibliche Wistar-Ratten (80-100g). Nach simultaner Applikation von 200 mg α -HCH und 10 mg 6-AN/kg Körpergewicht wurde zu verschiedenen Zeiten die Aspartat-Transcarbamylase-Aktivität in der Gehirn-Mitochondrien-Suspension bestimmt.

Säule 1 : ATCase-Aktivität nach Gabe von 200 mg α -HCH/kg

Säule 2 : ATCase-Aktivität nach Gabe von 10 mg 6-AN/kg

Säule 3 : ATCase-Aktivität nach simultaner Gabe von 200 mg α -HCH und 10 mg 6-AN/kg Körpergewicht

C.II. 4. Aktivität der mitochondrialen Gehirn-Aspartat-Trans-carbamylase nach Gabe von Folsäure.

Nach einmaliger i.v. Applikation einer hohen Dosis Folsäure (500 mg/kg) zeigte der zeitliche Verlauf der ATCase-Aktivität, während eines Beobachtungsintervalls von 120 hrs, keine signifikante Abweichung von den Kontrollwerten.

Die Indifferenz der Transcarbamylase-Reaktion gegenüber der Folsäure bzw. deren reaktionsspezifischer Komponente, dem Pteridinmolekül, kann einerseits bedingt sein durch die Unmöglichkeit einer Wechsel-Wirkungs-Beziehung zwischen der Folsäure und den eine ATCase-Aktivitätssteigerung bewirkenden Faktoren, andererseits dadurch, daß keine oder keine ausreichende Permeation der Folsäure durch die Blut-Hirn-Schranke und die sich anschließenden Membranen erfolgt. Eine grundsätzlich mögliche Beeinflussung der Enzym- oder Genaktivität würde dann wegen der ungenügenden Folsäure-Konzentration am Wirkort unterbleiben, oder innerhalb der Fehlerbreite der Bestimmungsmethode liegen.

Eine Erhöhung der Folsäure-Konzentration über 500 mg/kg Körpergewicht ist wegen der verstärkt auftretenden Krampfaktivität der Versuchstiere und den daraus resultierenden unspezifischen, diffusen Veränderungen unzweckmäßig.

D. Zusammenfassung:

Bei der Untersuchung über die pharmakologische Beeinflussung der hyaloplasmatischen Leber- und der mitochondrialen Gehirn-Aspartat-Transcarbamylase-Aktivität bzw. deren Verhalten gegenüber Actinomycin D wurden folgende Ergebnisse erhalten.

1. Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der ATCase-Aktivität im Leberhyaloplasma nach einmaliger Applikation von 200 mg α -HCH pro kg Körpergewicht zeigt, daß dieses Pharmakon eine Enzymaktivitätssteigerung bewirkt, deren Maximum nach 48 hrs erreicht wird und 100-150% der Kontrollaktivität beträgt und nach weiteren 48 hrs wieder im Bereich der Basalwerte liegt. (C.I.1.)
2. Die kombinierte simultane Gabe von α -HCH (200 mg/kg) und AMD (25 μ g/kg) bewirkt keine Änderung im zeitlichen Verlauf der ATCase-Aktivität, weder kommt es zur initialen Hemmung noch zur Phasenverschiebung des ATCase-Maximums. (C.I.2.)
 - a) Die ATCase-Aktivität beträgt 24 hrs nach einmaliger alleiniger Applikation von 1000 μ g/kg AMD weniger als 50% der Kontrollaktivität. Kein Tier überlebte 40 hrs nach Applikationsbeginn.
 - b) Die Gabe von 500 μ g AMD/kg Körpergewicht bewirkt nach 24 hrs eine 20%ige Hemmung der ATCase-Aktivität im Vergleich zu der Kontrollaktivität, die jedoch nach 48 hrs wieder erreicht wird.
 - c) Die simultane einmalige Applikation von α -HCH (200 mg/kg) und AMD (500 und 1000 μ g/kg) vermindert AMD-konzentrationsabhängig den alleinigen α -HCH-Effekt auf die ATCase-Aktivität.
 - d) AMD-Vorbehandlung vermindert den α -HCH-Effekt auf die ATCase-Aktivität.
3. Eine inanitionsabhängige Veränderung der ATCase-Aktivität war während der Versuche nicht zu beobachten.
4. Durch eine einmalige intravenöse Injektion einer hohen Dosis

Folsäure (500 mg/kg) wird die hyaloplasmatische Leber-ATCase in ihrer Aktivität gesteigert. (C.I.3a.)

5. 6-Aminonicotinsäureamid-Applikation bewirkt eine Aktivitätserhöhung der hyaloplasmatischen Leber-ATCase, deren Ausmaß bei geringer Dosierung 6-AN-konzentrationsabhängig ist. (C.I.3b.)
6. Nach einmaliger simultaner Gabe von 500 mg Folsäure/kg i.v. und 8 mg 6-AN/kg i.p. beträgt die Aktivitätssteigerung der Leber-ATCase nach 24 hrs annähernd dem additiven Effekt der Einzelwirkungen der beiden Pharmaka. (C.I.3c)
7. Simultane Applikation von Folsäure (500 mg/kg i.v.) und AMD (500 µg/kg i.p.) bewirkt eine vollständige Aufhebung des Folsäure-Effektes auf die ATCase-Aktivität. (C.I.3d.)
8. Die 6-AN-konzentrationsabhängige Stimulierung der Leber-ATCase-Aktivität wird in ihrem zeitlichen Verlauf durch unterschiedliche Dosen AMD nicht beeinflusst. (C.I.3e.)
9. Durch systematische Zellfraktionierung gelang der biochemische Beweis der Lokalisation der ATCase in den Mitochondrien des Gehirns. (C.II.1.)
10. Nach einmaliger Applikation von 200 mg α -HCH/kg Körpergewicht konnte eine Aktivitätssteigerung der mitochondrialen Gehirnatcase nachgewiesen werden, die annähernd 100% der Kontrollaktivität betrug. (C.II.2.)
11. Nach einmaliger simultaner Gabe von 200 mg α -HCH/kg und 10 mg 6-AN/kg ergab sich eine Aktivitätserhöhung der mitochondrialen Gehirnatcase nach 48 hrs, die deutlich über dem Wert lag, der nach alleiniger Gabe von 200 mg α -HCH/kg erhalten wurde, jedoch geringer war, als der Summation der Einzeleffekte entsprochen hätte. (C.II.3.)
12. Nach i.v.-Applikation einer hohen Dosis Folsäure (500 mg/kg)

zeigte der zeitliche Verlauf der mitochondrialen Gehirn-ATCase-Aktivität, während eines Beobachtungsintervalls von 120 hrs, keine signifikante Abweichung von den Kontrollwerten. (C.II.4.)

E. Literaturverzeichnis:

- ADAMS,D.H.: Some observations on the incorporation of precursors into RNA of the rat brain. J.of Neurochemistry 1965 Vol.12,pp.783-790
- ALLFREY,V.G.: Changes in chromosomal proteins at time of gene activation. Federation Proceedings Vol.29, No.4 July 1970
- ALTMANN,H.W.,K.LOESCHKE u.K.SCHENK: Über das Karyogramm der menschlichen Leber unter normalen und pathologischen Bedingungen. Virchows Arch. path. Anatomie 341, 85, 1966
- APPEL,S.H. u.P.PETTIS:Orotidine decarboxylase activity in rat brain. Federation Proceedings 26, 292 1969
- APPEL,S.H. u.D.H.SILBERBERG: Pyrimidine synthesis in tissue culture. J.of Neurochemistry 1968 Vol.15, pp. 1437-1443
- BASS,R.: Untersuchung zur Reindarstellung enzymatisch aktiver Zellfraktionen aus Warmblütergeweben.Dissertation Med.Fak. FU-Berlin 1967
- BASS,R. u.D.NEUBERT:Incorporation of thymidine into mitochondriale DNA. p.168. 3.FEBS Meeting, Warschau 1966 (M 90)
- BONAVITA,V.,R.GUARNERI,G.AMORE:Nicotinamide adenine dinucleotides in the convulsant rat brain. J.of Neurochemistry,Vol.17, 1613
- BOTTOMLEY,R.H.,C.A.LOVIG:Subcellular distribution of rat Aspartate-Trans-carbamylase. Biochim.Biophy.Acta Amst.148, 588-590, 1967
- BRADÉ,W.,H.HERKEN u.H.-J.MERKER:Schädigung und Regeneration renaler Tubuluszellen nach Folsäuregabe. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmakol. exp.Path.262, 1969, 228
- BRESNICK,E.:Early changes in pyrimidine biosynthesis after partial hepatectomy. J.Biol. Chem. 240, 2550 1965
- BRESNICK,E.:Inhibition by pyrimidines of aspartate transcarbamylase partially purified from rat liver.Biochim.Biophy.Acta Amst.67,1963, 425
- BRESNICK,E.,E.D.MAYFIELD and H.MOSSE:Increased activity of enzymes for de novo pyrimidine biosynthesis after orotic acid administration. Mol. Pharmacol. 4 , 173 1968
- BRESNICK,E. and H.MOSSE:Aspartate carbamoyltransferase from rat liver. Biochem. J. 101, 63 1966
- BRESNICK,E.,S.S.WILLIAMS and H.MOSSE:Rates of turnover of deoxythymidine kinase and of its template RNA in regenerating and control liver. Cancer Res. 27, 469 1967
- BURTON,K.:A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for colorimetric estimation of DNA. Biochem. J. 62, 315 1956
- CALVA,F.and P.P.COJEN:Carbamyl-phosphate-aspartate-transcarbamylase activity in regenerating rat liver. Cancer Res. 19, 679, 1959

- CAVALIERE, L.F. and R.G. NEMCHIN: The mode of interaction of Actinomycin D with Deoxyribonucleic acid. *Biochem. Biophys. Acta* 87, 641, 1964
- COOK, L., A.B. DAVIDSON, D.J. DAVIS and H. GREEN: Ribonucleic acid: Effect of conditioned behavior in rats. *Science* 141, 262, 1963
- COPER, H.: Die Bedeutung von Nicotinsäureamid für die krampfhemmende Wirkung der Hexachlorcyclohexane. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* 241, 194, 1961
- COPER, H., G. DEYHLE, D.v. HERRATH u. J. VEIT: Zum Mechanismus der schlafverlängernden Wirkung verschiedener Pharmaka. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* 260, 366, 1968
- COPER, H., I. HELGE u. H. HERKEN: Über die Wirkung des Hexachlorcyclohexans auf die DNP- und TPN-Nucleosidase des Gehirns. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* 243, 99, 1962
- COPER, H., H. HERKEN, J. KLEMPAU: Wirkungsverlust krampferzeugender Pharmaka durch Hexachlorcyclohexan. *Naturwissenschaften* 38, 69, 1951
- CYGAN, Z. and T. ZAK: The latent activities of aspartate transcarbamylase in beef liver homogenates. *Biochem. Biophys. Acta* 134, 289, 1967
- DAWSON, D.M.: Turnover of ribosomal RNA in the rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 1967, Vol. 14, pp. 939-946
- DAWSON, D.M.: On the phosphatidic acid of myelin. *Journal of Neurochemistry*, 1968, Vol. 15, pp. 144-146
- DONACHIE, W.D. and M.R. CURCI: An attempt to find pyrimidine inhibitors of a mammalian aspartate carbamoyltransferase. *Biochem. Biophys. Acta* 85, 338, 1964
- FLANGAS, A.L. and R.E. BOWMAN: Differential metabolism of RNA in neuronal-enriched and glia-enriched fractions of rat cerebrum. *Journal of Neurochemistry*, 1970, Vol. 17, pp. 1237-1245
- FITZHUGH, O.G., A.A. NELSON and J.P. FRAWLEY: The chronic toxicities of benzene hexachloride and its alpha, beta and gamma isomers. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 100, 59, 1950
- FREED, S.C. and S.S. GEORGE: Blood pressure reducing effect of Actinomycin D in rats. *Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.* 119, 773, 1965
- GEIGER, A. and S. YAMASAKI: Prolongation of brain survival-time. *Journal of Neurochemistry*, 1956 Vol. 1, pp. 93
- GERHART, J.C.: Aspartate Transcarbamylase. *Curr. Top. Cell. Regul.* 2, 275, 1970
- GERHART, J.C. and A.B. PARDEE: The enzymology of control by feedback inhibition. *J. Biol. Chem.* Vol. 237, No. 3, 1962
- GERHART, J.C. and A.B. PARDEE: Aspartate transcarbamylase, an enzyme designed for feedback inhibition. *Fed. Proceedings* 23, 727, 1964
- GOLDBERG, I.H. and E. REICH: Actinomycin inhibition of RNA-synthesis directed by DNA. *Fed. Proceedings* 23, 958, 1964

- HAMILTON, L.D., W.FULLER and E.REICH: Actinomycin D.
Nature, 198, 538, 1963
- HELD, I. and W.WELLS: Observations on purin metabolism in rat brain.
Journal of Neurochemistry, 1969, Vol. 16, pp.529-536
- HERKEN, H.: Änderung der Zellfunktion im Nervensystem durch Hexachlorcyclohexan.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 211, 143 1950
- HERKEN, H.: Funktionsstörungen im Nervensystem nach Einwirkung von Hexachlorcyclohexan. Ärztl. Wochenzeitschrift 1950, 193
- HERKEN, H.: Eingriffe am Nervensystem mit Hexachlorcyclohexan.
Arzneimittel-Forschung 1, 356, 1951
- HERKEN, H.: Pharmacological blockade of the pentose-phosphat-pathway and the problem of the selective vulnerability of the central nervous system.
Giorn. Acc. Med. Vol. CXXXIII Fasc. 1-12, 1970
- HERKEN, H.: Antimetabolic action of 6-Aminonicotinamide on the pentose phosphate pathway in the brain. In Proc. Symp. -Mechanisms of Toxicity- 1970. Ed. W.N.Aldridge London, Macmillan Co Ltd. p.189 1971.
- HERKEN, H. u. H.KIWITZ: Wirkungsverluste von Krampfgiften durch Hexachlorcyclohexan.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 215, 217, 1952
- HERKEN, H. u. H.KOLBE: Brain disorders induced by pharmacological blockade of the pentose phosphate pathway. Res. Commun. 36, 93-100
- HERKEN, H., P.VOSS, W.BRADE u. H.KOLBE: Induction of glucose-6-phosphat dehydrogenase and 6-Phosphogluconate dehydrogenase in the regenerating kidney after lesions by drugs.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 267, 297, 1970
- KANIG, K. u. W.KORANSKY: Zur Identifizierung und Bestimmung der freien Nucleotide des Gehirns.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 241, 484, 1961
- KAPLAN, N.O.: Coenzyme metabolism of the brain. Brady and Tower: The Neurochemistry of Nucleotids and Aminoacids p. 870, 1960
- KAPLAN, N.O., M.M.CIOTTI, J.van EYS and R.M.BURTON: Effect of pyridine derivatives on animal tissue diphosphopyridine nucleotidase.
J.Biol.Chem. 234, 134 1959
- KERSTEN, W. und H.KERSTEN: Zur Wirkungsweise von Actinomycinen.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiol. Chem. 327, 234 1962
- KOLBE, H., K.KELLER, K.LANGE u.H.HERKEN: Studies of carbohydrate metabolism in rat kidney after pharmacological blockade of pentose phosphate pathway. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 271, 93, 1971

- KORITZ, S.B. and P.P.COHEN: Colorimetric determination of carbamylamino-acids and related compounds. *J.Biol.Chem.* 209, 145, 1954
- LANGE, K., H.KOLBE, K.KELLER u.H.HERKEN: Der Kohlenhydratstoffwechsel des Gehirns nach Blockade des Pentose-Phosphat-Weges durch 6-Amino-nicotinsäureamid.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiol. Chemie Band 351 S. 1241-1252, Okt. 1970
- LOWENSTEIN, J.M. and P.P.COHEN: Studies on the biosynthesis of Carbamyl-aspartate. *Acid.J.Biol.Chem.* 220, pp. 57-70, 1956
- LUCK, D.J.L. and E.REICH: DNA in mitochondria of *Neurospora crassa*.
Proc. nat. Acid. Sci.(Wash.) 52, 931, 1964
- MAC DONALD, R.A.: "Lifespan" of liver cells. *Arch.Intern. Med.* 107, 335, 1961
- MARKUS, G., Mc.CLINTOCK and B.BUSSEL: Conformational changes in aspartate transcarbamylase. *J.Biol.Chem.* 246, 762, 1971
- MÜLLER, W. and D.M.CROTHERS: Actinomycin D. *J.Mol. Biol.* 35, 251
- NEUBERT, D., R.BASS und H.HELGE: Umsatzgeschwindigkeit der DNA in Mitochondrien von Warmblüterzellen.
Naturwissenschaften 53, 23 1966
- NEUBERT, D., H.HELGE und S.TESKE: Einige Eigenschaften der RNA-Polymerase-Reaktionen in Warmblüter-Mitochondrien.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak. exp.Path. 252, 1966
- NEUBERT, D., E.OBERDISSE and R.BASS: Biosynthesis and degradation of mammalian mitochondrial DNA. In: *Biochemical aspects of the biogenesis of mitochondria*, p. 103 Ed: E.C.Slater, J.M.Tager, S.Papa, E.Quagliariello. Bari: Adriatica Editrice 1968
- NEUBERT, D., S.TESKE, M.SCHMIEDER, E.KÖHLER, E.OBERDISSE: Vergleichende Untersuchungen über die DNA-Polymerase-Aktivität in isolierten Mitochondrien und Kernen von Wirbeltierzellen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 262, 1969
- OBERDISSE, E.: Pharmakologische Beeinflussung der Induktion von Fermenten im Pyrimidinstoffwechsel.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 260, 182, 1968
- OBERDISSE, E.: Einfluß von Pharmaka auf die Aktivität normaler und induzierter Fermente der Rattenleber.
Habilitationsschrift Med.Fak. Freie Universität Berlin 1970
- OBERDISSE, E. und D.NEUBERT: Unterschiede in der Empfindlichkeit verschiedener RNS-Synthese-Reaktionen gegenüber Actinomycin C₁.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 257, 318, 1967
- OBERDISSE, E., H.-I.SARKANDER und G.MUCK: Einfluß von α -Hexachlorcyclohexan auf Enzyme des Pyrimidin-Stoffwechsels und deren Beeinflussbarkeit durch Actinomycin.

- Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 266, 412, 1970
- OGUR, M. and G. ROSEN: The nucleic acid of plant tissues. The extraction and estimation of deoxypentose nucleic and pentose nucleic acid. Arch. Biochem. 25, 262, 1950
- PICCOLI, F., R. CAMARDA and V. BONAVITA: Purine and pyrimidine nucleotides in the brain of normal and convulsant rats. Journal of Neurochemistry, 1969, Vol. 16, pp. 159-168
- POGO, B. G. T., A. G. POGO, V. ALLFREY and A. E. MIRSKY: Changing patterns of histone acetylation and RNA-synthesis in regeneration of the liver. Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 59, 1968, 1337-1345
- RABINOVITZ, M., G. R. HONIG: Actinomycin D: Inhibition of protein synthesis unrelated to effect on template RNA-synthesis. Science 149, 1504, 1965
- REICH, E.: Actinomycin: Correlation of structure and function of its complexes with purines and DNA. Science 143, 684, 1964
- REICH, E., E. FRANKLIN and A. J. SHATKIN: Actinomycin D. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 48, 1238, 1962
- REICH, E. and I. H. GOLDBERG: Actinomycin and nucleic acid funktion. In: Davidson, N. J. and W. E. Cohn, Eds. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. III. p. 183, New York-London, Academic Press, 1964
- REMMER, H. u. H. -J. MERKER: Drug induced changes in the liver endoplasmatic reticulum: Association with drug-metabolizing enzyme. Science 142, 1657, 1963
- ROSENBUSCH, J. P. and K. WEBER: Subunit structure of Aspartate-Transcarbamylase from Escherichia coli. J. Biol. Chem. 246, 1944, 1971
- SCHLICHT, I., W. KORANSKY, S. MAGOUR u. R. SCHULTE-HERMANN: Größe und DNA-Synthese der Leber unter Einfluß körperfremder Stoffe. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 261, 26, 1968
- SCHMIEDER, M. u. D. NEUBERT: Nachweis einer DNS-Polymerase Aktivität in den isolierten Mitochondrien von Warmblüterzellen. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 255, 68, 1966
- SCHULTE-HERMANN, R.: Einfluß körperfremder Stoffe auf Enzyme des Arzneimittelstoffwechsels und auf Wachstumsprozesse der Leber. Inaug.-Diss. F.U. Berlin 1968 (Math. Nat. Fakultät)
- SCHULTE-HERMANN, R., R. THOM, I. SCHLICHT u. W. KORANSKY: Zahl und Ploidiegrad der Zellkerne unter dem Einfluß körperfremder Stoffe. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol. exp. Path. 261, 42, 1968

- SCHWARTZ, H.S., J.E. SODERGREN, M. GAROFALO, S.S. STERNBERG: Actinomycin D effects on nucleic acid and protein metabolism in intact and regenerating liver of rats.
Cancer Res. 25, 307, 1965
- SEEGMILLER, J.L., F.M. ROSENBLUM and W.N. KELLY: Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis.
Science 155, 1682, 1967
- SPORS, S.: Electron microscopic study on Aspartate Carbamoyltransferase in mitochondria of axons and dendrites in the temporal cerebrum of the rat.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. exp. Path. 266, 179, 1970
- STOCKEN, L.A. and W.S. STEVELY: Variation in the phosphat content of histon F₁ in normal and irradiated tissues.
Biochem. J. 110, 187, 1968
- THRELFALL, G., D.M. TAYLOR and A.T. BUCK: The effect of folic acid on growth and deoxyribonucleic acid synthesis in rat kidney.
Lab. Invest. 15, 1477, 1966 a
- THRELFALL, G., D.M. TAYLOR and A.T. BUCK: Stimulation of renal growth in the rat by folic acid.
Nature (Lond.) 212, 472, 1966 a
- VOHLAND, H.-W. und W. KORANSKY: Effect of α -HCH on metabolism and excretion of Pentetrazol (Cardiazol^R) in the rat.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. exp. Path. 272, 99 (1972)
- WEBER, K.: Aspartate Transcarbamylase, Nature (Lond.) 218, 1116 (1968)
- WEICHELBAUM, T.E.: Amer. J. Clin. Path. 10, 40 (1946)
- WELLS, W., D. GAINES and H. KÖNIG: Studies of pyrimidine nucleotide metabolism in the central nervous system.
Journal of Neurochemistry 1963 Vol. 10, pp. 709-723
- WELLS, R.D. and J.E. LARSON: Studies on the binding of Actinomycin D to DNA and DNA model polymers. J. Mol. Biol. 49, 319-342 (1970)
- WHEELER, G.P. and L.L. BENNETT: Studies related to the mode of action of Actinomycin D.
Biochem. Pharmacol. 11, 353, 1962
- WONG, K.P. and T.L. SOURKES: Uridine nucleotides in brain.
Journal of Neurochemistry, 1968, Vol. 15 pp. 201-203
- YATES, R.A. and A.B. PARDEE: Control of pyrimidine biosynthesis.
J. Biol. Chem. 221, 757, 1956
- ZAK, T. and R. TARNAWSKI: Aspartate Carbamoyltransferase activity in rat organs.
Archivum Immunologiae et Therapiae exp. 1969, 17, 338

F. Danksagung

Für die Stellung des Themas, die vielen Anregungen und freundlichen Hinweise sowie die kritische Durchsicht der Arbeit bin ich Herrn Prof. Dr. med. Hans Herken zu großem Dank verpflichtet.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Eckard Oberdisse für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Ratschläge bei der Ausführung der Versuche, die die Anfertigung dieser Arbeit ermöglichten.

Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Merker (Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin) sei für die Anfertigung und Überlassung der elektronenmikroskopischen Bilder von den verschiedenen Mitochondrien-Präparationen gedankt.

Frau Margret Kemmerle danke ich für die Anfertigung der in dieser Arbeit verwendeten Photographien.

G. Lebenslauf

- 1943 am 11. August wurde ich, Hans-Ingo Sarkander, als Sohn des Dr. med. Hans Sarkander und seiner Ehefrau Ingeborg geb. von Hedemann, in Wien geboren.
- 1949 Einschulung in Westensee bei Kiel/Holstein
- 1952 Übersiedlung nach Berlin und Besuch des Goethe-Gymnasiums
- 1965 nach zwischenzeitlicher Ausbildung als Industriekaufmann Abitur
- 1965 Immatrikulation an der F U Berlin (Humanmedizin)
- 1966 Vorphysikum an der F U Berlin
- 1968 Physikum an der F U Berlin
- ab 1968 alle 6 klinischen Semester an der F U Berlin studiert, während des klinischen Studiums Beginn der Doktorarbeit am Pharmakologischen Institut der F U Berlin
- 1971 Staatsexamen an der F U Berlin
- 1.Sept. 1971 4 Monate Medizinalassistent am Pharmakologischen Institut der F U Berlin
- 1.Jan. 1972 4 Monate Medizinalassistent auf der nephrologischen Abteilung ("künstliche Niere") im Klinikum Westend
- 1.Mai. 1972 4 Monate Medizinalassistent auf der chirurgischen Abteilung im Klinikum Steglitz
- 1.Sept. 1972 als wissenschaftlicher Assistent am Pharmakologischen Institut der F U Berlin tätig.

